

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H. Hartwig

STUDIEN ÜBER DIE TETANUSTOXIN-GEWINNUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Udo Holland
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1971

Journal-Nr. 728

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H. Hartwig

STUDIEN ÜBER DIE TETANUSTOXIN-GEWINNUNG

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Udo Holland
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1971

Journal-Nr. 728

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Vorsitzender:	Prof. Dr. J. Boch
Referent:	Prof. Dr. H. Hartwigk
Korreferent:	Prof. Dr. H.-J. Wintzer



Tag der Promotion: 11.2.1971

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	5
Literatur	6
Eigene Untersuchungen	18
A. Material und Methoden	19
1. Stamm	19
2. Nährmedien	19
3. Gewinnung des Inoculums	23
4. Kultivierung der beimpften Nährmedien	24
5. Reinigungs- und Konzentrationsmethoden	25
B. Ergebnisse	35
1. Eignung der verwendeten Nährmedien	35
2. Auswertung der Trockentoxine	39
3. Aufbewahrung und Haltbarkeit der Trockentoxine	46
4. Aussagen über das Molekulargewicht	48
Besprechung	52
Zusammenfassung	66
Verzeichnis benutzter Reagenzien	68
Literaturverzeichnis	69



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Einleitung

Das Tetanustoxin wird bei der Bestimmung der Antitoxineinheiten im Blutserum von Pferden in hochwirksamer Form benötigt, weil die Testung auf Antitoxineinheiten im Vergleich zu einem Standardserum des Paul-Ehrlich-Instituts in Frankfurt/M. erfolgt und die Frankfurter Methode der Testung mit relativ hohen Toxinverdünnungen arbeitet.

Unübersehbar groß ist die Zahl der verschiedenen Nährmedien und Techniken, die zur Gewinnung hochwirksamer Tetanustoxine empfohlen worden sind.

Im Hinblick darauf, daß im Institut Seren von Pferden turnusmäßig auf ihre I.E. in verschiedenen Zeitabständen nach der Impfung geprüft werden sollten, wurde mir die Aufgabe übertragen, Nährmedien und Techniken anzuwenden, die zuverlässig mit einem vorhandenen Tetanusstamm die Gewinnung eines Toxins ermöglichten, das den Anforderungen der Frankfurter Standardisierungsmethode entsprach.

L i t e r a t u r

Nährböden

Für die Anzüchtung des Tetanuskeimes und die Gewinnung hochwertiger Toxinfiltrate wurde früher eine Vielzahl von flüssigen Nährböden empfohlen, so die Nährböden von LEGROUX und RAMON 1933, PREVOT 1939, RAMON, AMOUREUX und POCHON 1942, TAYLOR 1945, MUELLER und MILLER 1940, 1945, 1947, 1954, SURJAN 1956, STONE 1953, LATHAM, BENT und LEVINE 1962.

Der Nährboden von LEGROUX und RAMON 1933 bestand aus peptisch verdaulichem Rindfleisch, 5 g getrockneten roten Blutkörperchen pro Liter Nährboden und 1,2 % Glucose. Der pH wurde auf 5,8 - 6,0 eingestellt. Die Bebrütung erfolgte aerob bei 37° C während 11 Tagen.

Aus ökonomischen und arbeitstechnischen Gründen wurde das Rindfleisch von D'ANTONA und VALENSIN 1934 durch Pferde- oder Kalbfleisch ersetzt.

Dieses Nährmedium war eines der ersten auf dem Wege zur Entwicklung der halbsynthetischen Nährmedien und fand in Europa weite Verbreitung. Noch im Jahre 1960 wurden die Wehrpflichtigen in der Schweiz mit einem Toxoid immunisiert, das mit Hilfe dieses Nährmediums hergestellt worden war (REGAMEY 1959).

Das Nährmedium von PREVOT 1939 besteht aus einem peptisch verdaulichem Rindfleisch, frischer Rinderleber und 0,8 % Glucose. Der pH-Wert wird auf 5,8 eingestellt, und die Bebrütung erfolgt 11 Tage lang bei 33° C.

Die Nährmedien von RAMON, AMOUREUX und POCHON 1942 sind Weiterentwicklungen des Nährmediums von PREVOT 1939. Eine Variante beispielsweise enthält Pferdefleisch und Pferdeleber, eine andere außerdem papainverdautes Fleisch und Malzextrakt (RAMON et al. 1943 a, b).

Um Anaphylaxien zu vermeiden, die durch das Pepton in der Kulturbouillon hervorgerufen werden könnten, schlug TAYLOR 1945 ein Nährmedium vor, das dem Nährboden von MUELLER und MILLER aus dem Jahre 1945 ähnlich war. Es enthielt ein Autolysat aus Schweinemagen sowie Fleischwasser. Dazu wurden 0,025 - 0,05 mg Eisen/l, 0,25 % NaCl, 0,75 % Glucose und 0,2 mg/l Nikotinsäure gegeben. Der pH wurde ebenfalls auf 5,8 eingestellt. Die Bebrütungszeit betrug 11 Tage bei einer Temperatur von 34 - 36° C.

Viel Mühe haben die Autoren MUELLER und MILLER aufgewandt, um ihr erstes 1940 veröffentlichtes Nährsubstrat zur Erzielung einer höheren Toxizität des Kulturfiltrates zu verbessern. Sie gingen dabei von einem Nährboden aus, den sie schon mit Erfolg für die Herstellung von Diphtherietoxin verwandt hatten. Es handelt sich um ein Caseinhydrolysat, dem Tryptophan, Glucose, Leberextrakt und 0,3 mg Fe/l zugefügt wurden.

In den folgenden Jahren untersuchten die Autoren FEENEY, MUELLER und MILLER 1943 a, b die für Wachstum und Toxinogenese notwendigen Faktoren, wie insbesondere Vitamine, Aminosäuren und Metallionen. Weiterhin untersuchten MUELLER und MILLER in den darauffolgenden Jahren den Einfluß der Temperatur (1948 a) und der durch die biochemische Aktivität der Keime produzierten Gase (MUELLER, MILLER und LERNER 1948).

Die Nährmedien von MUELLER und MILLER haben vor allem wohl deshalb so weite Verbreitung gefunden, weil die Kulturfiltrate, die mit diesen Medien gewonnen wurden, im Vergleich mit den von anderen Autoren empfohlenen Medien eine relativ geringe Toxizitätsschwankung bei wiederholtem Ansatz zeigten:

Tabelle 1: Übersicht über die von verschiedenen Autoren mit eigenem Nährmedium erreichten Lf*-Werte

Nährmedien	Lf*/ml Kulturfiltrat
LEGROUX u. RAMON (1933)	10-15
PREVOT (1939)	15-25
RAMON, AMOUREUX u. POCHON (1942)	10-30
TAYLOR (1945)	20-30
MUELLER u. MILLER (1947)	60-80
MUELLER u. MILLER (1951)	80-100
MUELLER u. MILLER (1954)	130-150
SURJAN (1956)	12-62

Lf* = limes floculationis, das ist die Flockulationseinheit, die der Menge Antigen entspricht, welche von 1 I.E. (Internationale Einheit) Tetanus-Antitoxin neutralisiert wird.

Die Reaktion wird in vitro ausgeführt und wird (im positiven Falle) durch eine Ausflockung sichtbar.

Daß diese geringe Schwankung der Toxizität nicht nur von dem von MUELLER und MILLER 1945 isolierten Harvard-Stamm des Cl. tetani abhängig ist, der außerordentlich viel Tetanospasminprotein erzeugt, zeigen die Ergebnisse von SURJAN 1956, der für den von ihm empfohlenen Nährboden ebenfalls den Harvard-Stamm als Inoculum benutzt (siehe Tabelle 1).

SURJAN ist der Meinung, das Milieu von MUELLER und MILLER aus dem Jahre 1954 sei impraktikabel für die Routineherstellung von Tetanustoxin, und schlägt ein Nährmedium vor, das folgendes enthält: Rinderherzwasser, Hydrolysate aus pepsin-, trypsin- und erepsinverdaulichem Fleisch und Casein und 0,75 % Glucose. Der pH wird auf 7,2 eingestellt. Die Bebrütungszeit beträgt 5 - 6 Tage bei 34 - 35° C.

In den letzten Jahren wurden Untersuchungen über die Toxine von *Clostridium tetani* fast ausschließlich mit dem Nährmedium von MUELLER und MILLER aus dem Jahre 1954 und der Modifikation dieses Mediums von LATHAM, BENT und LEVINE aus dem Jahre 1962 durchgeführt. Das Nährmedium von LATHAM, BENT und LEVINE 1962 ist frei von nativen Proteinen. Die Autoren folgen damit den Überlegungen von STONE 1953, der u.a. aus folgenden Gründen die Eliminierung von Proteinen als Nährstoffquelle von *Cl. tetani* anstrebte:

- a) um die mögliche Gefahr allergischer Impfreaktionen durch Sensibilisierung mit Bestandteilen des Mediums zu verhindern oder zu verringern
- b) um die Reinigungsverfahren zur Erzielung eines möglichst sauberen Tetanospasminproteins nicht durch Ballaststoffe oder Fremdproteine zu belasten.

Für vorliegende Untersuchungen wurden die Medien von MUELLER und MILLER aus dem Jahre 1954 und die Modifikation von LATHAM, BENT und LEVINE aus dem Jahre 1962 benutzt. Diese Nährsubstrate sind später eingehend besprochen.

Die Eliminierung von nativem Protein aus dem Nährmedium hat zwar einerseits zur Folge, daß die Toxizität des Kulturfiltrates absinkt, daß aber andererseits die Toxizität der gereinigten Toxine und Toxoide, die mit proteinfreien Nährmedien gewonnen werden, höher ist, als die Toxizität von gereinigten Toxinen und Toxoiden von Nährmedien, die noch Proteine enthalten (STONE und LEVINE 1954).

Tabelle 2: Nachstehende Übersicht gibt die Werte in Lf/ml an, die STONE 1953 fand

Nährmedium <u>mit</u> Fleischwasser		Nährmedium <u>ohne</u> Fleischwasser	
Rohtoxoid	gereinigtes Toxoid	Rohtoxoid	gereinigtes Toxoid
31 Lf/ml	382 Lf/ml	23 Lf/ml	496 Lf/ml

Stamm und Behandlung des Inoculums

In älteren Arbeiten (vor 1945) wird zumeist nicht angegeben, mit welchem Stamm von *Clostridium tetani* die Untersuchungen durchgeführt wurden. Ebenso fehlen Angaben über die Behandlung des Inoculums. Erst nachdem MUELLER und MILLER im Jahre 1945 einen sehr toxischen Stamm von *Cl. tetani* (Harvard-Stamm) isoliert hatten, werden die benutzten Stämme genannt. Dabei spielen der Harvard-Stamm oder Varianten desselben bei den meisten Autoren (MUELLER und MILLER 1945, PICKETT, HOEPRICH und GERMAIN 1945, PILLEMER, WITTLER und GROSSBERG 1946, STONE 1953, STONE und LEVINE 1954, LARGIER 1956, HARDEGREE 1965, LATHAM, BENT und LEVINE 1962, SALENSTEDT und TIRUNARAYANAN 1966 et al.) eine besondere Rolle.

Als Inoculum empfehlen MUELLER und MILLER eine Kultur von *Cl. tetani*, die 24 Stunden anaerob bei 35° C bebrütet wurde (MUELLER und MILLER 1945, 1948, 1954).

Kultivierungsbedingungen

Folgende Autoren empfehlen in den verschiedenen Jahren folgende Bebrütungstemperaturen und -zeiten sowie folgende pH-Bereiche:

Tabelle 3: Übersicht über die von verschiedenen Autoren angegebenen Kultivierungsbedingungen

Autoren	Jahr	Temperatur	Zeit	pH
LEGROUX u. RAMON	1933	37° C	11 Tage	5,8-6,0
PREVOT	1939	33° C	11 "	5,8
RAMON, AMOUREUX u. POCHON	1942	33° C	11 "	5,8
TAYLOR	1945	34-36° C	11 "	7,0
KOCH u. KAPLAN	1953	35-35,5° C	9-10 "	7,2-7,4
MUELLER u. MILLER	1954	35° C	5-6 "	7,1-7,2
SURJAN	1956	34-35° C	5-6 "	7,2
LARGIER	1956	37° C	7-9 "	7,2
LATHAM, BENT u. LEVINE	1962	36° C	7 "	7,0

Eingehendere Untersuchungen über den Einfluß der Bebrütungs-temperatur sowie über die Bebrütungszeit haben die Autoren MUELLER und MILLER 1948 a bzw. MÖHLMANN und DEHMEL 1959 durchgeführt.

MUELLER und MILLER stellten fest, daß das Temperaturoptimum für *Clostridium tetani* (Harvard-Stamm) bei 35,1° C liegt. Ein Abweichen von dieser Temperatur um $\pm 1^{\circ}$ C hatte eine bis zu 30 % verringerte Toxinproduktion zur Folge. Die Autoren erreichten außerdem eine Verdoppelung der Toxinproduktion, indem sie die Kulturgefäße im Wasserbad bebrüteten. Sie schreiben diesen Effekt der besseren Temperaturkonstanz des Wasserbades zu.

KOCH und KAPLAN 1952 setzten zur Gewinnung von Tetanustoxin eine Methode ein, die sehr einfach in der Anwendung und in den Mitteln ist und dennoch außerordentlich gute Ergebnisse bringt: NaCl 0,7 % und neutralisierte Thioglykolsäure 0,05 %

werden in einen Cellophanbeutel gegeben und mit einem Tetanus-Inoculum beimpft. Der verschlossene Beutel wird in ein flüssiges Nährmedium eingetaucht und 9 - 10 Tage bei $35 - 35,5^{\circ}\text{C}$ bebrütet. Das Nährmedium besteht aus folgenden Substanzen:

- 2 % enzymatisches Caseinhydrolysat
- 0,5 % NaCl
- 0,25 % Na_2HPO_4
- 0,04 % KH_2PO_4

Der pH-Wert wird auf 7,2 - 7,4 eingestellt.

Die Toxinmenge pro ml reifer Kultur war bei dieser Kultivierungsmethode 80-fach höher als bei Anwendung üblicher Verfahren unter Verwendung des gleichen Nährmediums. Außerdem erhielten sie auf diese Weise ein Toxin, das von vornherein sehr rein war. Die Toxizität pro mg Stickstoff war etwa halb so groß wie die Toxizität des von PILLEMER et al. 1948 hergestellten kristallinen Toxins, d.h. der Reinheitsgrad des von KOCH und KAPLAN hergestellten Toxins betrug 50 %.

MÖHLMANN und DEHMEL 1959 haben bei ihren Untersuchungen festgestellt, daß der Toxingehalt einer Tetanus-Bouillonkultur schon nach 7 Tagen beträchtlich war und nach längerer Bebrütungszeit (14 u. 28 Tage) nur noch wenig zunahm.

Bei weiteren Untersuchungen von Faktoren, welche die Toxinproduktion beeinflussen könnten, fanden MUELLER, MILLER und LERNER 1948, daß ein Verbleiben der durch die biochemische Aktivität der Tetanuskeime entstehenden Gase (insbesondere CO_2 , H_2 , H_2S) im Kulturgefäß einen ungünstigen Einfluß auf die Toxinproduktion hat. Sie empfehlen daher Kulturgefäße mit breiter Öffnung, die lediglich mit dem üblichen Baumwoll- (oder Zellwatte-) Stopfen verschlossen werden, so daß die entstehenden Gase entweichen können.

Den negativen Einfluß auf die Toxinproduktion schreiben

sie insbesondere dem H_2S zu, das zusammen mit dem im Nährmedium vorhandenen Eisen kolloidales Eisensulfid bildet und damit die Schwärzung der Kulturen verursacht.

DEDIC und KOCH 1956 fanden bei Untersuchungen, daß der Zusatz von Co^{++} in einer Menge von $4 \mu g Co^{++}/ml$ Nährmedium die aerobe Kultivierung von *Clostridium tetani* (und anderen Anaerobiern) ermöglichte. Sie sind der Meinung, daß die Kobaltwirkung darin besteht, im Nährmedium reduzierende Bedingungen zu schaffen und so den Sauerstoff-Partialdruck zu vermindern, der normalerweise für Anaerobier zu hoch ist.

Außerdem fanden sie eine Verminderung der Gasproduktion.

Der Autor LEV 1956 stellte ergänzend zu den Untersuchungen von DEDIC und KOCH fest, daß allein die Zugabe von $4 \mu g Co^{++}/ml$ Medium nicht in der Lage ist, ausreichend reduzierende Bedingungen zu schaffen, sondern daß eine Austreibung der Luft aus dem Nährmedium durch Kochen erfolgen muß.

Konzentration und Reinigung des Tetanustoxins

Seit BRIEGER und COHN 1893 bedient man sich zur Herstellung haltbaren (Trocken-) Toxins der Fällung des Toxins aus dem Kulturfiltrat mittels Ammoniumsulfat. "Bei Ganzsättigung (mit Bodenkörper) rahmt das Toxin auf und kann dann mittels Spatels abgehoben" (zit. n. H. SCHMIDT 1941), durch Dialyse gegen destilliertes Wasser vom Ammoniumsulfat gereinigt und getrocknet werden.

In der Folgezeit wurde diese Methode variiert und mit anderen Methoden kombiniert. Sie ist auch heute noch Bestandteil einer Reinigungsmethode, bei der die Fällung mit Ammoniumsulfat den Anfangsschritt bildet, nämlich der Reinigung mittels Gelfiltration oder Gelchromatographie (ROBB 1967).

Die häufige Anwendung dieser Methode wird durch die Tatsache erklärt, daß hierbei eine Eiweißdenaturierung vermieden wird und somit die biologische Aktivität der Fermente, Toxine, Antikörper und anderen Eiweißstoffe erhalten bleibt (GUBARJEW 1952).

MASCHMANN 1931 wandte bei seiner Methode der Konzentration ebenfalls Ammoniumsulfat an, wobei er die gesamte Tetanuskulturbouillon mit dem Salz sättigte, den Toxinrauh in 0,85 %iger NaCl wieder löste und durch Zentrifugieren (30 min bei 5000 U/min) von Keimen und Sporen trennte. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt. Daran schlossen sich dann die Reinigung des (flüssigen) Rohtoxins durch Adsorption an Tonerde und die Elution des gereinigten Toxins durch 0,05 %ige Ammoniaklösung mit darauffolgender Dialyse und Trocknung an.

EATON und GRONAU 1938 und PICKETT, HOEPRICH und GERMAIN 1945 reinigten das Tetanustoxin durch Fällung mit Cadmiumchlorid mit nachfolgender Elution des zentrifugierten Präzipitates mit 2 %igem Natriumphosphat und einer zweiten Fällung mit Ammoniumsulfat mit anschließender Dialyse und Trocknung.

LEVINE und STONE 1951 konzentrierten und reinigten Roh-toxin und -toxoid durch fraktionierte Ausfällung mit Ammoniumsulfat. Nach 70 %iger Sättigung der Kulturbouillon mit Ammoniumsulfat wird diese Mischung über Nacht bei 5° C stehengelassen und dann zentrifugiert, das zentrifugierte Präzipitat wird in destilliertem Wasser gelöst und mit Ammoniumsulfat zur 15 %igen Sättigung gebracht. Diese Lösung wird keimfrei filtriert und dann mit Ammoniumsulfat zu 50 % gesättigt, das sich bildende Präzipitat wird zentrifugiert, dialysiert und getrocknet.

PILLEMER, WITTLER und GROSSBERG 1946 gelang es, das Tetanustoxin zu reinigen und zu kristallisieren. Hierzu wird das Roh toxin in fünf Arbeitsgängen mit Methanol verschiedenen

Prozentgehaltes unter Beachtung von pH-Werten, Temperatur und Ionenstärke behandelt. Die pH-Werte liegen im sauren Bereich, die Temperaturen zwischen -4° und -8° C. Die Kristalle zerfallen bereits wieder bei Temperaturen über -5° C. RAMON, BOIVIN und RICHOU 1936, 1937 sowie BOIVIN und IZARD 1937 konnten das Tetanustoxin durch Fällung mit Trichloressigsäure in hoher Konzentration abscheiden: das Kulturfiltrat wird mit gleicher Menge Trichloressigsäure versetzt, das Präzipitat zentrifugiert und in 3 %iger Na_2HPO_4 -Lösung aufgenommen, durch Tierkohle filtriert, dialysiert und getrocknet.

PENFOLD, TOLHURST und WILSON 1941 geben folgendes Verfahren zur Konzentration von Toxinen an, das andere Autoren u.a. zur Konzentration von Diphtherie-, Botulinus- und Staphylokokkentoxin angewandt hatten: dem Kulturfiltrat werden 25 % seiner Gewichtsmenge entsprechend festes NaCl und nach Lösung des Salzes 2 % Eisessig zugegeben. Das entstehende Präzipitat wird zentrifugiert, neutralisiert, dialysiert und getrocknet.

RAYNAUD 1951 beschreibt ein Verfahren, mit dem er das Tetanustoxin direkt aus den Tetanuskeimen gewinnt: eine 72-stündige Tetanuskultur wird zentrifugiert, die Tetanuskeime, die den größten Teil des Zentrifugates bilden, werden in einer hypertonen Extraktionsflüssigkeit suspendiert, die aus 1,0 M NaCl und 0,1 M Natriumzitrat besteht. Die Extraktion wird fünf Tage lang bei 4° C durchgeführt, danach wird der Zellextrakt von den Zelltrümmern durch Zentrifugation getrennt. Dieser Zellextrakt, der Tetanustoxin in konzentrierter Form enthält, kann nun wiederum Reinigungsverfahren, wie etwa der Fällung mit Ammoniumsulfat, unterzogen werden.

RAYNAUD, NISMAN und PRUDHOMME 1950 gewinnen den Zellinhalt der Tetanuskeime durch Behandlung der Zellen mit Ultraschall, auch hier bildet der so gewonnene Zellinhalt nur

das Material für das Reinigungsverfahren.

Ein Verfahren zur Konzentration von proteinhaltigen Lösungen, das ohne Chemikalien arbeitet und somit für Proteine ein sehr schonendes Verfahren darstellt, ist die Konzentration mit Hilfe der Ultrafiltration.

Bei dieser Methode fließt die zu konzentrierende Lösung horizontal über die Filteroberfläche. Dank eines gewissen Druckes oder Soges (je nach Konstruktion des Apparates) passieren die kleinen, filtrierbaren Anteile der Lösung (einschließlich der Lösungsmittel) das Filter. Die zu konzentrierende Lösung befindet sich in einem Vorratsbehälter und fließt durch eine enge Zuleitung über die Filtermembran zurück in den Vorratsbehälter. Dieser Kreislauf wird durch eine Pumpe geregelt. Die Ausgangsflüssigkeit kann bei einem derartigen Verfahren beliebig konzentriert werden. Die Filtermembran besteht aus einem Kollodiumfilm oder aus Zellulose-Ester mit bestimmter Porengröße. Die Methode erlaubt u.a. die Eliminierung der Elektrolyte, der Zucker sowie des Stickstoffs, der nicht an Protein gebunden ist. Das Endprodukt, d.h. die konzentrierte Lösung enthält immer noch alle Proteine der Ausgangslösung, mögen sie nun spezifisch sein oder nicht. Aus diesem Grunde ist es angezeigt, die Reinigung mit anderen Methoden fortzusetzen. TASMAN und RAMSHORST 1952 kombinieren die Ultrafiltration mit der Ausfällung durch Ammoniumsulfat.

Eine verhältnismäßig neue Methode zur Reinigung von Proteingemischen und damit auch zur Reinigung von Tetanus-Rohtoxinen stellt die Gelchromatographie dar. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß sich Proteingemische beim Durchwandern eines Gels, das aus polymeren Stoffen besteht und als Trennmittel wirkt, auf Grund der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der im Proteingemisch enthaltenen verschiedenen Proteine durch das Gel, bedingt durch deren verschieden großes Molekulargewicht,

auftrennen lassen, so daß die einzelnen Proteine isoliert werden können.

Die Gelchromatographie wird bei der Reinigung bzw. Isolierung von bakteriellen Toxinen fast immer mit anderen Methoden kombiniert, die die Toxine hochkonzentrieren.

So gewinnen z.B. folgende Autoren ein (Roh-) Toxinkonzentrat, bevor sie die Gelchromatographie anwenden: MURPHY und MILLER 1967 mit durch Ammoniumsulfat konzentriertem Tetanus-Zellextrakt, SALENSTEDT u. TIRUNARAYANAN 1965 mit der Ultrafiltration, ROBB 1967 mit der Ultrafiltration oder mit der Ammoniumsulfat-Methode.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Gelchromatographie, die später näher erläutert wird, in Kombination mit der Ammoniumsulfat-Methode angewendet.

Die Wertbemessung von Tetanustoxin geschieht in vivo durch die Feststellung der Dosis letalis minima (DLM) mittels Injektion einer bestimmten Menge toxinhaltiger Lösungen verschiedener Verdünnungsstufen in eine Hautfalte, einen Muskel, eine Vene oder in den Bauchraum von weißen Mäusen oder Meerschweinchen mit jeweils bestimmtem Körpergewicht.

In vitro geschieht die Wertbemessung durch Feststellung der Flockulationseinheiten (Lf) bei der Austestung mit Tetanus-Antitoxin.

Dieses Verfahren wurde von RENAUX 1924 und RAMON u. GRASSE 1926 schon für die Wertbemessung von Diphtherietoxin angewandt. SCHOLZ 1924 und DESCOMBEY 1924, 1925 führten diese Methode für die Wertbemessung von Tetanustoxin und -Antitoxin ein. Die durch Letalitätstest und Flockungsreaktion erhaltenen Ergebnisse stehen nicht immer in festen Relationen zueinander, wobei hinzukommt, daß nicht alle Toxine prompt mit Antitoxinen flockulieren, so daß die Flockungsreaktion den Letalitätstest nicht ersetzen, sondern nur ergänzen kann (SCHMIDT 1941, REGAMEY 1959).

E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n

Unter Tetanustoxin wird in vorliegender Arbeit das Tetanospasmin verstanden und die Frage offen gelassen, inwieweit bei der Gewinnung und Testung des Toxins das Tetanolysin beteiligt war. Es galt zu prüfen, welches Kulturmedium, welche Bedingungen während der Anzüchtung und welche Reinigungs- und Konzentrationsmethoden den Anforderungen der Tetanus-Antitoxin-Testung genügten.

Ferner war zu klären, welche Methoden und Techniken bei vertretbarem Aufwand jederzeit wiederholbar waren.

Die Untersuchungen hatten folgenden Gang: Gewinnung des Inoculums, Herstellung des Nährmediums und dessen Beimpfung mit Impfkultur, 7-tägige Bebrütung bei 35° C, Aufbereitung der toxinhaltigen Kultur zur Isolierung, Reinigung und Konzentration des Tetanustoxins. Danach erfolgte die Titrierung des gewonnenen Toxins an weißen Mäusen und die Feststellung der Wirksamkeit im Vergleich zum Tetanustoxin der Behring-Werke.

A. Material und Methoden

1. Stamm

Ich benutzte für meine Untersuchungen den in der Stammsammlung des Instituts vorhandenen Stamm Clostridium tetani Dessau, der dem Institut in früherer Zeit aus der Sammlung von Herrn Prof.Dr.Dr.med.vet.h.c. Josef Fortner vom Bundesgesundheitsamt zur Verfügung gestellt worden war. Der Stamm war auf Le-Le-Bouillon unter Paraffinverschluß aufbewahrt worden und wurde auf diesem Nährsubstrat subkultiviert.

2. Nährmedien

Nachdem sich gezeigt hatte, daß die Kultivierung des Stammes auf Le-Le-Bouillon sowie auf dem von LOGAN u.a. 1945 angegebenen Substrat nur zu ungenügender Toxinbildung führte, benutzte ich für meine Untersuchungen Kulturmedien nach Angaben von MUELLER und MILLER 1947 sowie eine Modifikation des Mueller-Miller-Mediums aus dem Jahre 1954 nach Angaben von LATHAM, BENT und LEVINE aus dem Jahre 1962.

Diese Modifikation wurde von mir in ihrer Zusammensetzung nochmals geändert, da sich mit der Modifikation von LATHAM, BENT und LEVINE 1962 keine befriedigenden Resultate erzielen ließen. Die Gründe liegen wahrscheinlich in der Benutzung eines anderen Stammes und eines anderen Caseinpräparates als die Autoren LATHAM, BENT und LEVINE 1962 empfohlen haben.

Die Nährmedien haben bei einer Menge von 1000 ml folgende Zusammensetzung:

Tabelle 4: Zusammensetzung der benutzten Nährmedien

Bestandteile pro l	I	II	III	IIIa
Casein, trypt.verd.	15 g	22,5 g	25,0 g	25,0 g
Herzwasser	250 ml	50 ml	0	0
Glucose	7,5 g	11,0 g	8,0 g	8,0 g
NaCl	2,5 g	2,5 g	2,5 g	2,5 g
Na ₂ HPO ₄	0,5 g	2,0 g	0	0
KH ₂ PO ₄	0,17 g	0,15 g	0	0
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,05 g	0,15 g	0,1 g	0,1 g
Cystin	125 mg	250 mg	125 mg	125 mg
Tyrosin	125 mg	500 mg	0	0
Ca-Pantothenat	0	1,0 mg	1,0 mg	1,0 mg
Uracil	0	2,5 mg	1,5 mg	1,5 mg
Nikotinsäure	0	0	0,25 mg	0,25 mg
Thiamin	0	0,25 mg	0,25 mg	0,25 mg
Riboflavin	0	0,25 mg	0,25 mg	0,25 mg
Pyridoxin	0	0,25 mg	0,25 mg	0,25 mg
Biotin	0	2,5 µg	2,5 µg	2,5 µg
Vitamin B ₁₂	0	0	0,05 µg	0
CoCl ₂	0	0	0	8,8 mg
Eisen, reduz.	0,25-0,5 g	0,5 g	0	0
FeCl ₃ ·6 H ₂ O	0	0	32,0 mg	8,0 mg
Phenolrot 0,2%ig	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml

I = Mueller-Miller-Medium aus dem Jahre 1947

II = Mueller-Miller-Medium aus dem Jahre 1954

III = Medium nach LATHAM, BENT u. LEVINE aus d. Jahre 1962

IIIa = Modifikation von Medium III

Die Nährmedien werden im einzelnen wie folgt hergestellt:

Nährmedium I

Zur Herstellung des Rinderherzwassers wird rohes Rinderherzfleisch mit dem Fleischwolf fein zerkleinert und mit gleicher Gewichtsmenge Wasser unter ständigem Rühren zum Kochen gebracht. Dann wird dieses Produkt durch einen Wattefilter gegeben, um das Herzwasser von den gröberen Bestandteilen zu trennen. Das Herzwasser wird im Kühlschrank nach Durchschütteln mit Chloroform aufbewahrt.

Cystin wird wegen seiner schweren Löslichkeit in nicht saurem Milieu in einer salzsauren Stammlösung (2 %ige HCl-Lösung) gelöst und dann dem Nährmedium zugegeben. Nach Zugabe von tryptisch verdaulichem Casein, Glucose, NaCl, der Puffersalze, Tyrosin und Phenolrot wird mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wird auf 7,0 - 7,2 eingestellt.

Die Sterilisation erfolgt im Dampftopf bei 100° C während 90 Minuten, um eine optimale Qualität für die Toxin-gewinnung zu erzielen. Nach LATHAM, BENT und LEVINE 1962 sollen das Zusammenwirken von Glucose und Cystin bei Temperatureinwirkung einen günstigen Einfluß auf die Qualität des Nährmediums und somit auf die Toxinproduktion haben.

Danach wird das durch Trockensterilisierung keimfrei gemachte Eisen hinzugefügt.

Nährmedium II

Dieses Medium unterscheidet sich im wesentlichen vom Nährmedium I dadurch, daß es Ca-Pantothenat, Uracil, Thiamin, Riboflavin, Pyridoxin und Biotin enthält. Die Menge des Herzwassers ist reduziert, die Zugabe von tryptisch verdaulichem Casein vermehrt.

Einige Zutaten werden in Form von Stammlösungen zugegeben, die getrennt zubereitet werden.

Es werden gelöst: in 2 %iger HCl Cystin und Tyrosin
in 1 %iger HCl Uracil
in 25 %igem Alkohol Ca-Pantothenat,
Thiamin, Riboflavin, Pyridoxin, Biotin

Die weitere Behandlung (Auffüllen mit destilliertem Wasser, pH-Einstellung, Sterilisation und Eisenzugabe) erfolgt wie bei Nährmedium I.

Nährmedium III (und IIIa)

Hauptmerkmal dieses Nährmediums, einer Modifikation des Nährmediums II, ist das Weglassen des Herzwassers, wodurch das Nährmedium frei von nativen Proteinen ist. Neben den unterschiedlichen Mengen einiger Zutaten unterscheidet sich dieses Nährmedium vom Medium II durch Verzicht auf die Puffersalze Na_2HPO_4 und KH_2PO_4 und des Tyrosins und durch Hinzufügen von Nikotinsäure und Vitamin B_{12} . An Stelle des reduzierten Eisens in Pulverform wird das Eisen in Form des Eisen-III-Chlorids ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) zugegeben.

Für die Toxingewinnung erwies es sich als günstig, an Stelle von Vitamin B_{12} - das Kobalt enthält - Co^{++} als CoCl_2 in einer Menge von $4 \mu\text{g Co}^{++}/\text{ml}$ Medium hinzuzufügen und die Menge des $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ von $32,0 \text{ mg/l}$ auf $8,0 \text{ mg/l}$ zu reduzieren (Nährmedium IIIa).

Der pH-Wert wird auf 7,0 - 7,2 eingestellt, die Sterilisation zweimal durchgeführt, d.h. das Nährmedium wird zweimal 90 Minuten lang bei 100°C sterilisiert. Der zeitliche Abstand zwischen beiden Sterilisationen beträgt ca. 6 Stunden. Die wiederholte Sterilisation war bei meinen Untersuchungen notwendig, da das von mir benutzte Casein einen Sporenbildner mit außerordentlich

schneller Vermehrungstätigkeit enthielt, der durch eine einmalige Sterilisation bei 100°C nicht abgetötet wurde.

3. Gewinnung des Inoculums

Die Beimpfung des Nährbodens sollte nach Möglichkeit mit einem weitgehend einheitlichen Kulturmateriail vorgenommen werden, d.h. möglichst viele Keime sollten sich in der gleichen Generation befinden. Bei einer Tetanus-Bouillonkultur (im Reagenzröhrchen) ist dies etwa bei einem Alter von 24 Stunden der Fall. Die Keime sind dann bei Anfärbung nach GRAM noch fast ausschließlich grampositiv und haben Sporen nicht ausgebildet.

Keime einer 48-stündigen Kultur sind teils grampositiv, gramlabil oder gramnegativ und befinden sich in den verschiedensten Stadien der Sporulation.

Nach Beimpfung des Mediums I und II mit einem Inoculum aus Le-Le-Bouillon kam es nur zu einem geringen Wachstum, da die Tetanuskeime an das Mueller-Miller-Medium nicht adaptiert waren. Die Adaptation gelang jedoch relativ schnell, nachdem der Stamm in 5 Passagen über das Mueller-Miller-Medium kultiviert worden war. Der Stamm zeigte dann nach 24-stündiger Bebrütung ein gutes Wachstum, das an der Trübung des Nährmediums und an intensiver Gasbildung erkennbar war.

Eine nochmalige Adaptation war bei Einführung des (proteinfreien) Nährmediums III notwendig. Auch hier war die Adaptation nach 5 Passagen über das Medium III erreicht.

Die Gewinnung des Inoculums erforderte folgende Arbeitsgänge:

- a) 20-minütiges Kochen des in Reagenzröhrchen abgefüllten Mediums (10 ml) zur Austreibung der Luft
- b) Abkühlen in Leitungswasser auf Brutschranktemperatur (35°C)

- c) Beimpfung mit 0,1 - 0,2 ml einer 18 - 24-stündigen Tetanuskultur
- d) 24-stündige Bebrütung bei 35° C unter anaeroben Bedingungen im evakuierten Zeissler-Topf oder Exsikkator ohne Paraffinverschluß

4. Kultivierung der beimpften Nährmedien

Die Nährmedien wurden nach der Sterilisation in fließendem Wasser auf etwa Brutschranktemperatur abgekühlt und mit 0,5 ml eines 24-stündigen Inoculums beimpft. Die Nährmedien befanden sich in 500 ml- bzw. 1000 ml-Steilbrustflaschen, die mit Zellstoffstopfen verschlossen wurden.

Der Tetanuskeim hat ein für die optimale Toxinproduktion sehr enges Temperaturoptimum, dieses liegt bei 35° C (MUELLER und MILLER 1948a). Ein Abweichen der Brutschranktemperatur von nur 0,5 - 1,0° C kann schon eine Verminderung der Toxinproduktion von bis zu 30 % zur Folge haben.

Da der Thermostat des von mir benutzten Brutschrankes bei Einstellung auf 35° C eine Schwankung der Temperatur von 34,7° - 35,3° C zuließ, benutzte ich zur weitgehenden Temperaturkonstanz folgende Vorrichtung: die Steilbrustflaschen mit dem Nährmedium stellte ich in einen Exsikkator, der etwa bis zur Höhe des Flüssigkeitsspiegels des Kulturmediums mit Wasser gefüllt wurde.

Ich machte mir somit einerseits die hohe Wärmeleitfähigkeit sowie andererseits die Trägheit des Wassers bezüglich Temperaturschwankungen bei äußeren Temperaturänderungen zunutze (MUELLER und MILLER 1948 a). Die Abweichung von der optimalen Temperatur 35° C (im Brutschrank) von etwa $\pm 0,3^{\circ}$ C wurde durch die Versuchsanordnung weitgehend aufgefangen, so daß der für die Toxinproduktion

optimale Temperaturbereich gewährleistet war, wie durch Thermographen überprüft wurde.

Die Bebrütung der Nährmedien erfolgte unter aeroben Bedingungen. Zur Bebrütung der Medien wurde der Exsikkator verschlossen, das zugehörige Ventil im Deckel des Exsikkators jedoch entfernt, so daß ein Gasaustausch möglich war. Sinn dieser Versuchsanordnung war, die gebildeten Gase entweichen zu lassen, insbesondere das H_2S , welches die Toxinproduktion vermindert und zur Ausfällung großer Mengen kolloidalen Eisensulfids führt, was außerdem die Toxinaufbereitung stört (MUELLER, MILLER und LERNER 1948).

Die Nährmedien I und II wurden 5 Tage, die Nährmedien III und IIIa 7 Tage bebrütet.

5. Reinigungs- und Konzentrationsmethoden

Nach Ende der Bebrütungszeit zentrifugierte ich die toxinhaltige Kulturflüssigkeit 30 Minuten lang bei 5000 U/min. Ich verzichtete auf eine Filtration durch Seitz-Filter, da die Asbestfilter als Adsorbens wirken und einen Teil der Toxinmenge fixieren.

Die für eine Keimabtrennung verhältnismäßig niedertourige Zentrifugation erfordert allerdings eine äußerste Vorsicht bei der weiteren Aufbereitung der toxinhaltigen Flüssigkeit, da diese noch zahlreiche Tetanusbazillen enthält. Eine völlige Keimfreiheit wurde bei den späteren Arbeitsgängen durch Zentrifugation des Toxinkonzentrates (s.u.) sichergestellt. Mit Toxinkonzentrat beimpfte Blutagarplatten sowie beimpftes Nährmedium blieben steril. Ebenso verliefen Infektionsversuche an Mäusen mit subletalen (Toxinkonzentrat-) Dosen immer negativ.

Die pH-Werte der Nährmedien waren unterschiedlich abgefallen. Sie lagen bei Medium I und II zwischen 5,5 und

6,2, bei den proteinfreien Medien III und IIIa recht konstant bei pH 6,8.

Das Ziel aller Reinigungs- und Konzentrationsmethoden ist, das Tetanospasmin aus der toxinhaltigen Kulturflüssigkeit zu isolieren. Bei den von mir angewandten Methoden und Techniken ging ich immer von dem durch die Zentrifugation der toxinhaltigen Kulturflüssigkeit erhaltenen toxinhaltigen Überstand aus.

a) Aufbereitung der Kulturflüssigkeit mit Ammoniumsulfat

2 Raumteile einer kaltgesättigten sterilen Ammoniumsulfatlösung werden mit einem Raumteil toxinhaltiger Flüssigkeit vermischt. Es entsteht eine hellgelbe opake Flüssigkeit. Das Gemisch bleibt 16 - 18 Stunden bei etwa 20° C stehen, dann wird 30 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, und zu dem braunen, teerartigen Zentrifugat wird soviel destilliertes Wasser hinzugefügt, daß sich das Zentrifugat löst. Darauf erfolgt eine 24-stündige Dialyse gegen destilliertes Wasser bei einmaliger Wassererneuerung nach 6 - 8 Stunden.

Zur Sicherstellung der Keimfreiheit wird das Dialysat nun in Spitzröhrchen bei 5000 U/min 30 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig in Petrischalen dekantiert und anschließend getrocknet. Die Trocknung soll schnell vor sich gehen, da das Tetanustoxin an der Luft sehr labil ist und rasch zerfällt. Ich verwendete dazu einen Exsikkator mit Phosphorpentoxid-Trockenmittel-Füllung.

b) Aufbereitung mit NaCl und Eisessig nach PENFOLD u. Mitarb. 1941

Zu der toxinhaltigen Flüssigkeit wird soviel NaCl zugegeben, wie 25 % ihrer Gewichtsmenge entsprechen, d.h. zu 100 ml Volumen (spezifisches Gewicht ~1) werden 25 g

NaCl gegeben. Nach völliger Lösung des Kochsalzes werden 2 % Eisessig zugegeben. Es entsteht eine Trübung und Ausflockung, das Gemisch bleibt 16 - 18 Stunden im Kühlschrank stehen und wird dann 30 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, der Niederschlag wird mit 1/10 n NaOH neutralisiert und mit destilliertem Wasser aufgenommen. Anschließend erfolgt eine 24-stündige Dialyse gegen destilliertes Wasser, wobei das Wasser nach 6 - 8 Stunden einmal erneuert wird. Danach erfolgt nochmals eine Zentrifugation zur Sicherung der Keimfreiheit und die Trocknung mit Hilfe von Phosphor-pentoxid.

c) Aufbereitung nach Angaben von MASCHMANN 1931

Zu der toxinhaltigen Flüssigkeit wird unter ständigem Umrühren soviel Ammoniumsulfatsalz hinzugegeben, bis es zu einer Ausflockung mit anschließender Aufräumung kommt. Eine halbe Stunde nach dieser Aufräumung ist der "Rahm" so fest, daß er mit einem Glasspatel im Ganzen von der Flüssigkeit abgehoben werden kann. Zu diesem Rahm wird soviel 0,85 %ige NaCl-Lösung gegeben, daß sich dieser gut löst. Bei Aufbereitung von 1000 ml toxinhaltiger Flüssigkeit werden etwa 15 ml 0,85 %iger NaCl-Lösung benötigt. Danach wird eine halbe Stunde bei 5000 U/min zentrifugiert, der Überstand wird dekantiert und mit gleichem Volumen 0,85 %iger NaCl-Lösung verdünnt. Nun wird wiederum Ammoniumsulfatsalz zugegeben, bis es erneut zu einer Aufräumung kommt. Dieser Rahm wird ebenso wie bei der ersten Aufräumung behandelt, insgesamt erfolgt diese Prozedur dreimal. Die letzte Aufräumung wird in destilliertem Wasser gelöst und ebenfalls gegen destilliertes Wasser dialysiert und anschließend getrocknet.

d) Aufbereitung nach Angaben von LEVINE u. STONE 1951

Zu der toxinhaltigen Flüssigkeit wird Ammoniumsulfatsalz

bis etwa zur 70 %igen Sättigung hinzugegeben, das Gemisch bleibt ca. 10 Stunden im Kühlschrank, damit sich die Ausflockung an der Oberfläche absetzen kann (Aufrauhmung). Die aufgerahmte Masse wird 20 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert und das Zentrifugat mit 1/16 des Volumens der Ausgangsflüssigkeit destillierten Wassers gelöst. Die Lösung wird mit Ammoniumsulfatsalz zur 15 %igen Sättigung gebracht und dann durch ein Seitz-Filter gegeben. Das Filtrat wird mit Ammoniumsulfatsalz zur 50 %igen Sättigung gebracht und dann zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und zu dem Niederschlag wird soviel destilliertes Wasser zugefügt, daß dieser sich gut löst.

Auch bei dieser Methode erfolgt darauf die Dialyse und Trocknung wie bei den anderen schon beschriebenen Methoden. Die Zentrifugation nach der Dialyse kann entfallen, da die Keimfreiheit bei dieser Methode schon vorher bei der Filtration durch Seitz-Filter erreicht wurde.

e) Aufbereitung mit Hilfe der Gelchromatographie

Die Gelchromatographie ist ein chromatographisches Verfahren, das die Trennung von Molekülen auf Grund unterschiedlicher Molekülgrößen erlaubt.

Das trennende Mittel ist ein Stoff, der sich Kationen und Anionen gegenüber indifferent verhält (SEPHADEX). SEPHADEX besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk von Polysaccharidketten, die in Wasser oder wässrigen Lösungen quellen und ein Gel mit Poren bilden, deren Anzahl und Größe vom SEPHADEX-Typ abhängen.

Der Trenneffekt hängt nun von der Größe und damit dem Weg der Moleküle durch das Gelbett ab. Moleküle, die kleiner sind als die Poren der Gelpartikel, wandern durch diese hindurch, Moleküle, die größer sind als die größten Poren der Gelpartikel, können nicht in das Gel

eindringen, ihnen bleibt nur der Weg zwischen den Gelpartikeln, dem sog. äußeren Gelbett, in dem sich das Lösungsmittel befindet.

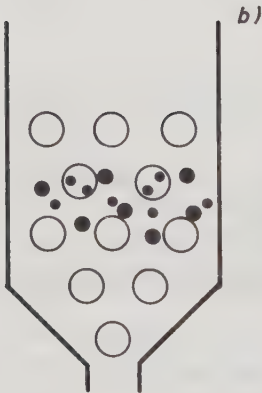
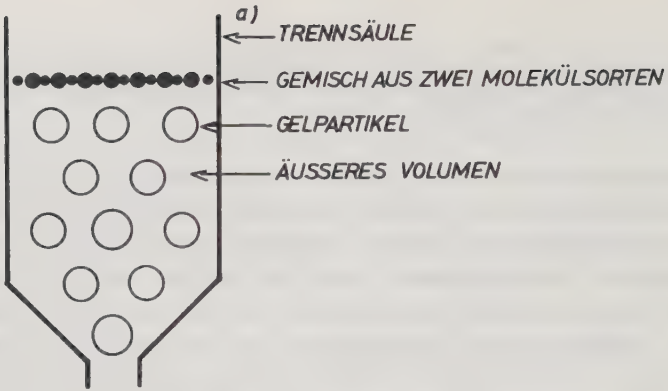
Die größeren Moleküle werden somit schneller transportiert als die kleineren, die durch die Diffusion durch die Gelpartikel hindurch verlangsamt werden. Im Eluat einer mit SEPHADEX-Gel gefüllten Säule erscheinen somit die Moleküle oder Stoffe eines zu trennenden Gemisches in der Reihenfolge abnehmender Molekülgröße (s. Abb. 1).

Die Versuchsanordnung besteht aus folgenden Geräten:

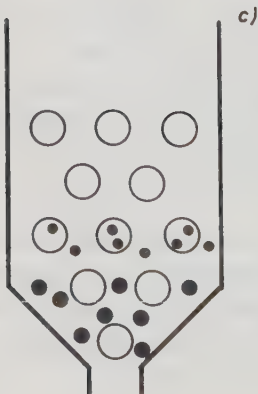
- a) der Trennsäule, einem Hohlglasrohr, das mit geeignetem SEPHADEX-Gel gefüllt wird
- b) dem Absorptiometer, das die optische Dichte des durchfließenden Materials mit Hilfe des ultravioletten Lichtes mißt
- c) dem Schreiber, der die jeweils gemessene optische Dichte fortlaufend aufzeichnet
- d) dem Fraktionssammler, der zu bestimmende Mengen eines flüssigen Materials in einzelnen Röhrchen sammelt.

Die Aufbereitung von toxinhaltiger Flüssigkeit mit Hilfe dieser Methode hatte folgenden Verlauf: ich verwendete für meine Untersuchungen eine relativ große Trennsäule mit einem Innendurchmesser von 6,0 cm und einer Länge von 120 cm. Die Säule wurde mit dem SEPHADEX-Gel Typ G-150 gefüllt. Auf dieses Gel wurden etwa 50 ml mit Hilfe der Ammoniumsulfat-Methode gewonnenes Toxinkonzentrat aufgetragen. Als Elutionsmittel wurde eine Lösung von 0,05 M Tris-Puffer + 0,2 M NaCl mit einem pH von 7,5 verwendet.

Das Eluat, welches die Trennsäule an der Basis durch einen Schlauch verläßt, wird zum Absorptiometer weitergeleitet, durchfließt dort eine Küvette, durch die der ultraviolette Meßlichtstrahl (278 μ) tritt, und fließt



DIE KLEINEN MOLEKÜLE DURCHWANDERN AUCH
DIE GELPARTIKEL, DIE GROSSEN MOLEKÜLE
WERDEN NUR IM ÄUSSEREN VOLUMEN
TRANSPORTIERT



DIE GROSSEN MOLEKÜLE VERLASSEN AUF
GRUND DES SCHNELLEREN TRANSPORTES IM
ÄUSSEREN VOLUMEN DIE TRENNSÄULE ZUERST

ABB. 1: SCHEMA DER
GELCHROMATOGRAPHIE
(nach DETERMANN 1967)

dann zum Fraktionssammler, der jeweils eine Menge Eluat, z.B. 10 ml in ein Röhrchen abtropfen (s. Abb. 2, 3 u. 4).

Durch Testung des Eluates auf Toxizität konnte ich feststellen, in welchen Fraktionen Toxin vorhanden war. Diese Fraktionen goß ich zusammen, um aus ihnen das Toxin in Trockenform zu gewinnen. Zu diesem Zweck wurden die vereinigten Fraktionen (etwa 400 ml) lyophilisiert. Das Lyophilisat (das neben Toxinprotein hauptsächlich Puffersalz und Kochsalz enthielt) wurde in 100 ml destilliertem Wasser wieder gelöst und gegen 0,001 M Kaliumphosphat-Lösung (aus 1,0 M primärer und 1,0 M sekundärer Kaliumphosphat-Lösung 1:1) mit einem pH von 8,0 dialysiert, um die Salze zu entfernen. Das Dialysat wurde wiederum lyophilisiert. Es entstand als Endprodukt ein lockeres gelbliches Pulver.

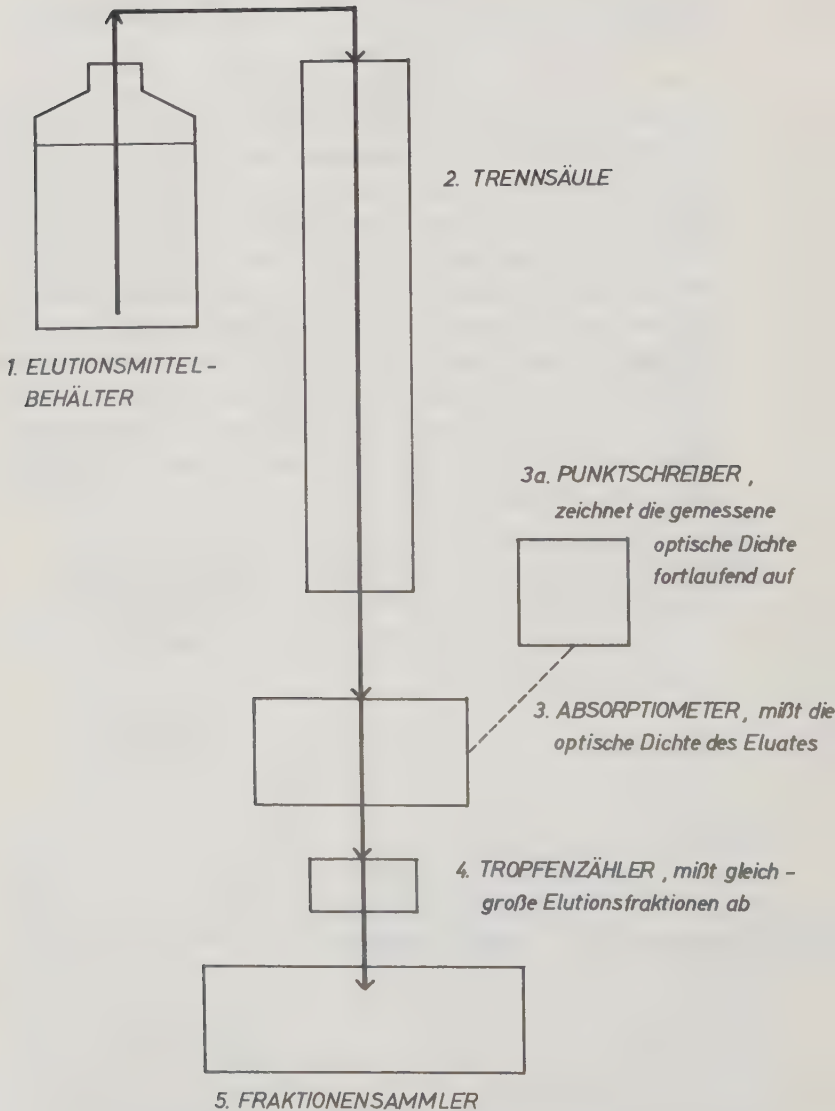
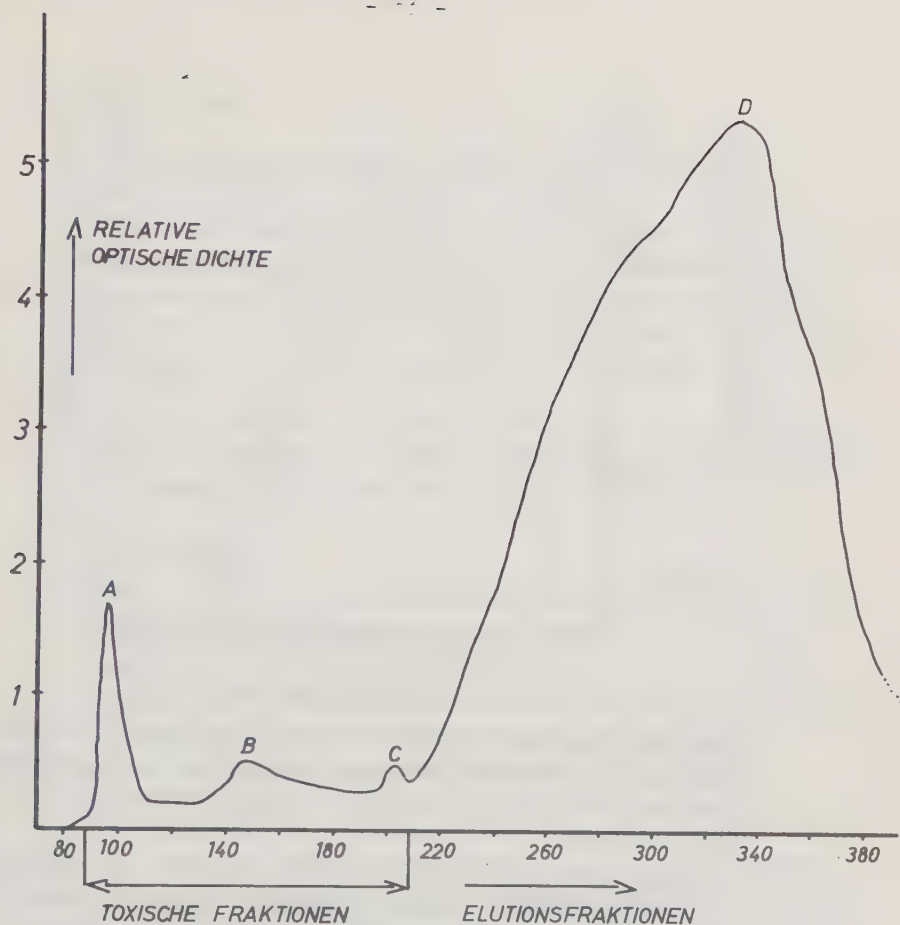
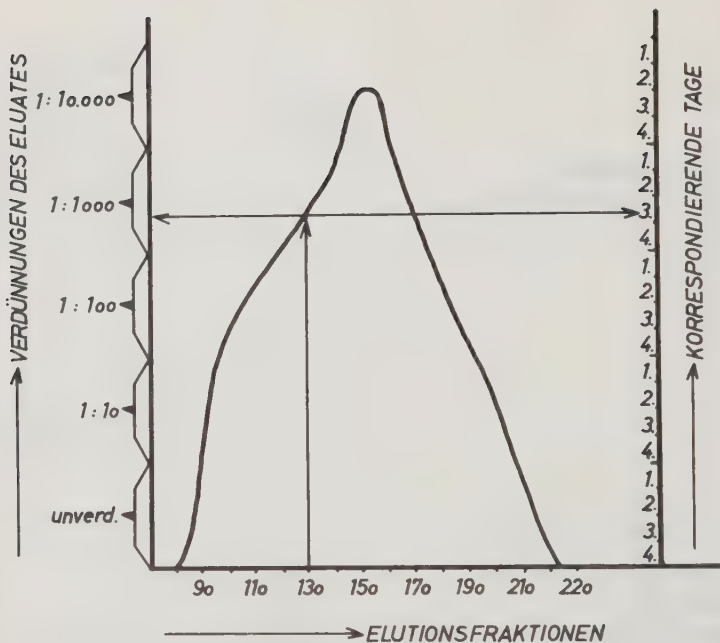


ABB. 2: VERSUCHSANORDNUNG BEI DER GELCHROMATOGRAPHIE



A = HOCHMOLEKULARER BALLAST
 B = TETANOSPASMIN
 C = HUMANHÄMOGLOBIN
 D = NIEDERMOLEKULARER BALLAST

ABB. 3: ELUTIONSDIAGRAMM EINER VORGEREINIGTEN TETANUSTOXINLÖSUNG, DER HUMANHÄMOGLOBIN ALS STANDARDSUBSTANZ FÜR DIE MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG BEIGEgeben WURDE



ERLÄUTERUNG: MAN KANN ANHAND DIESER KURVE DIREKT ABLESEN , WELCHE FRAKTIONEN BEI WELCHER VERDÜNNUNG AM WIEVIELTEN TAGE NACH DER INJEKTION BEI DEN VERSUCHSTIEREN DEN TOD HERVORRUFEN.

BEISPIEL (eingezeichnet): ZIEHT MAN VON DER ABSZISSE BEI FRAKTION NR.130 EINE SENKRECHTE LINIE BIS DIESE DIE KURVE SCHNEIDET , SO KANN MAN AUF DEN ORDINATEN ABLESEN , DASS DIE FRAKTION NR.130 BEI EINER VERDÜNNUNG VON 1:1000 AM 3.TAG NACH DER INJEKTION EINE LETALE WIRKUNG HATTE.

INJEKTIONSVOLUMEN: 0,5 ml /MAUS

ABB. 4: TOXIZITÄT DER ELUTIONSFRAKTIONEN
VERGLEICHE ABBILDUNG 3

B. Ergebnisse

1. Eignung der verwendeten Nährmedien

Die Gewinnung hochwirksamer Toxine machte notwendig, die bisher in der Literatur empfohlenen Nährmedien auf ihre Eignung zur Toxingewinnung mit dem Stamm *Clostridium tetani* Dessau zu prüfen und im Falle ungenügender Wirksamkeit die Medien in ihrer Zusammensetzung zu ändern.

Die Kultivierung des Stammes Dessau in den von mir verwendeten Nährmedien wurde häufig wiederholt und zeigte im einzelnen folgende Ergebnisse:

Nährmedium I

Innerhalb von 24 Stunden wurde das beimpfte Nährmedium tiefschwarz infolge Bildung kolloidalen Eisensulfids. Nach etwa drei Tagen begann sich das Eisensulfid als flockiger Niederschlag abzusetzen, und am vierten Tag war dieser Vorgang beendet. Der Überstand war nur schwach getrübt und hatte eine gelbliche Färbung.

Die Aufbereitung des zentrifugierten Überstandes brachte keine befriedigenden Ergebnisse, d.h. die letale Dosis des mit der Ammoniumsulfat-Methode hergestellten Trockentoxins lag bei etwa 0,5 mg Toxin pro weißer Maus. Die Toxizität war somit rund 2300-fach niedriger, als die des Standard-Toxins der Behring-Werke (s. Tabelle 5).

Nährmedium II

Das Nährmedium II, welches sich vom Medium I vor allem durch Zusatz von Ca-Pantothenat, Uracil, Thiamin, Riboflavin, Pyridoxin und Biotin unterscheidet, schwärzte sich ebenfalls innerhalb 24 Stunden nach Beimpfung und auch hier begannen sich zwischen dem dritten und vierten Tag flockige schwarze Partikel abzusetzen.

Dies ist ein Vorgang, der von den Autoren MUELLER und MILLER 1948 nicht nur als erwünscht, sondern auch als unbedingtes Anzeichen guter Toxinbildung erachtet wurde. MUELLER und MILLER glaubten festgestellt zu haben, daß das Ausmaß der Trübung der Toxinbildung direkt proportional sei.

Die Auswertung des Trockentoxins zeigte nun, daß das Medium II offenbar für die Gewinnung hochwertigen Toxins geeigneter war als das Nährmedium I, denn die Auswertung des durch die Ammoniumsulfat-Methode gewonnenen Trockentoxins ergab eine letale Toxizität bei der Toxinlösung Ia, deren Impfdosis von 0,4 ml $2,2 \cdot 10^{-5}$ g Toxin enthält.

Weißer Mäuse von etwa 20 g starben am zweiten Tag nach der Injektion. Die Toxinlösung II, die $2,2 \cdot 10^{-6}$ g Toxin pro Impfdosis enthält, zeigte bei den Mäusen nur noch die Symptome "Spur" bis "leicht", eine Injektion mit der Toxinlösung III verlief negativ (s. Tabelle 5). Die Toxizität dieser aus dem Nährmedium II gewonnenen Trockentoxine war somit nur noch etwa 100-fach geringer als die des Behring-Toxins.

Nährmedium III und IIIa

Das Nährmedium III hatte im wesentlichen die gleiche Zusammensetzung wie das Medium II, jedoch ist Herzwasser, das in seiner Qualität nicht standardisierbar war und somit auch die Qualität des Nährmediums bzw. die Toxinbildung in wechselhafter Weise beeinflusste, nicht mehr Bestandteil des Nährmediums. Das Eisen wurde nun in einer genau definierten Menge, und zwar in löslicher Form als FeCl_3 zugegeben. Wachstum und Toxinbildung sind an optimale Eisenmengen gebunden (LERNER 1951, BARD und GUNSALUS 1950), d.h. bei optimalen Eisenmengen im Medium werden bevorzugt Toxinproteine produziert und weniger verunreinigende Proteine.

Wichtig war auch der Zusatz von Vitamin B₁₂ oder in entsprechender Menge CoCl₂. Kobalt bzw. Vitamin B₁₂, das Kobalt enthält, schafft im Medium reduzierende Bedingungen und begünstigt so die Kultivierung des Tetanuskeimes unter aeroben Bedingungen. Der Austausch von Vitamin B₁₂ mit entsprechender Menge CoCl₂ hatte keinen Einfluß auf die Wertigkeit des Trockentoxins. Vitamin B₁₂ ist nach Untersuchungen von KAUFMAN und HUMPHRIES 1958 nicht erforderlich und wirkt auch nicht direkt wachstumsfördernd.

Das Nährmedium III zeigte im Verlauf der siebentägigen Bebrütung nicht das Phänomen der Trübung oder Schwärzung der Kulturflüssigkeit durch kolloidales Eisensulfid.

Im Gegensatz zu MUELLER und MILLER 1948 geben die Autoren LATHAM, BENT und LEVINE 1962 an, daß eine Schwärzung des Mediums nicht erwünscht ist. Sie sagen ferner, daß das Auftreten des "Pigments" in jedem Falle eine Minderung der Toxinproduktion zur Folge hat und daß die Stärke der Trübung etwa umgekehrt proportional zur Toxinproduktion ist. Das Nährmedium soll, abgesehen von der Trübung durch das Keimwachstum, während der Bebrütungszeit eine fahlgelbe Färbung behalten.

Ich fand diese Angaben durch meine Untersuchungen bestätigt: die Toxizität der siebentägigen Kulturflüssigkeit betrug bei nicht getrübtem Kulturmedium etwa 20.000 DLM Maus/ml, bei leichter Trübung < 10.000 DLM Maus/ml und bei tiefschwarzer Färbung nur noch < 2.000 DLM Maus/ml.

Diese Ergebnisse wurden auch bestätigt durch die wechselnde Menge des durch die Ammoniumsulfat-Methode konzentrierten Toxins: nicht getrübte Kulturen erbrachten mehr als 600 mg Trockentoxin pro Liter Kulturflüssigkeit, leicht getrübte etwa 200 mg und tiefschwarze Kulturen weniger als 100 mg.

LATHAM, BENT und LEVINE 1962 vertreten die Auffassung,

daß das Auftreten einer Schwärzung des Nährmediums ein Zeichen für ein Wachstum der Keime unter nicht optimalen Bedingungen ist.

Bei meinen Untersuchungen trat die übermäßige Bildung von kolloidalem Eisensulfid bei Verunreinigung des Nährmediums mit Luftkeimen auf, die bei Beimpfung des Nährbodens durch die relativ große Öffnung der Steilbrustflaschen hineingelangen konnten, ferner nach einem Chargenwechsel des bei meinen Untersuchungen verwendeten Caseinpeptons. Durch keimfreie Filtration des fertigen Nährmediums und durch Überprüfung der Keime aus der bewachsenen siebentägigen Kulturflüssigkeit mittels Subkultivierung auf aerob und anaerob kultivierten Traubenzucker-Blutagarplatten überzeugte ich mich davon, daß keine verunreinigenden Keime die Ursache der Schwärzung des Nährmediums waren.

Ich konnte nach wiederholten Versuchen feststellen, daß bei einer Reduzierung der Zugabe von Eisen-III-Chlorid und gleichzeitiger Erhöhung der Zugabe von Kobaltchlorid eine sichtbare Bildung von kolloidalem Eisensulfid ausblieb und die Kulturflüssigkeit somit während der Bebrütungszeit ihre fahlgelbe Färbung behielt.

Das Nährmedium IIIa enthielt nur noch $8 \text{ mg FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O} / 1000 \text{ ml}$. Die Reduzierung der Eisengabe hat auf die Toxinproduktion nur einen geringen Einfluß: nach LATHAM, BENT und LEVINE 1962 betrug die Minderproduktion von Toxin bei ihren Untersuchungen nur etwa 10 %.

Die Reduzierung der Eisengabe allein konnte die Eisensulfidbildung nicht befriedigend verhindern. Dies erreichte ich erst durch Erhöhung des CoCl_2 -Zusatzes von $4,66 \mu\text{g} / 1000 \text{ ml}$ Medium auf $8,8 \mu\text{g} / \text{ml}$ Medium. $8,8 \mu\text{g CoCl}_2$ enthalten etwa $4 \mu\text{g Co}^{++}$, die Autoren DEDIC und KOCH 1956 geben dies als optimale Gabe bei aerober Kultivierung von *Cl. tetani* an.

Die Auswertung des mit der Ammoniumsulfat-Methode hergestellten Trockentoxins ergab, daß es der Toxizität des von den Behring-Werken hergestellten Trockentoxins mit einer DLM von $2,2 \cdot 10^{-7}$ g entsprach.

2. Auswertung der Trockentoxine

Da das von mir gewonnene Toxin zur Testung von Pferdeseren auf Tetanus-Antitoxin-Gehalt dienen sollte, prüfte ich die von mir hergestellten Trockentoxine in den gleichen Verdünnungsstufen, wie sie für die Testung der Pferdeseren nach der Frankfurter Methode angegeben worden sind (DEHMEL 1938).

Bei dieser Methode wird mit zwei Toxinlösungen gearbeitet: die Toxinlösung I enthält $0,000.55 \text{ g/ml} = 5,5 \cdot 10^{-4} \text{ g/ml}$, die Toxinlösung II (eine 100-fache Verdünnung der Lösung I) enthält $5,5 \cdot 10^{-6} \text{ g/ml}$.

Als Lösungs- und Verdünnungsmittel benutzte ich eine Mischung aus 20 ml primärer Kaliumphosphat-Lösung 1/15 M und 80 ml sekundärer Natriumphosphat-Lösung 1/15 M.

Bei den Toxinkontrollen der Seratestung mit Behring-Toxin werden Mäusen 0,4 ml einer Toxinlösung aus 0,9 ml Pufferlösung + 0,1 ml Toxinlösung II subkutan in die linke oder rechte Kniefalte injiziert. 0,4 ml dieser Lösung enthalten $2,2 \cdot 10^{-7} \text{ g}$ Tetanustoxin und töteten eine weiße Maus von etwa 20 g am 3. oder 4. Tag nach der Injektion und nach Ablauf folgender Symptomenreihe (zit. n. WAIBEL 1955):

<u>Symbole</u>	<u>Symptome</u>	<u>Erläuterung</u>
$\pm$	Spürchen (Spch)	= Zucken eines Beines, das beim Hochhalten der Maus am Schwanz deutlich wird. Dabei sind die Zehen geschlossen (Injektionsseite).
+	Spur (Sp)	= Das Bein ist leicht gestreckt, der Lauf dadurch leicht behindert. Der Schwanz wird nach der Injektionsseite hin gestreckt.
#	leicht (l)	= Das Rückgrat ist leicht gekrümmt, der Lauf stärker behindert, das Bein schleift leicht nach.
##	deutlich (dtl)	= Das ganze Bein ist steif und wird nach hinten gestreckt, die Maus ist nicht mehr voll beweglich.
###	stark (st)	= Das Rückgrat ist bogenförmig gekrümmt, das Bein wird steif gehalten. Die Maus kann sich nur noch im Kreise bewegen.
####	sehr stark (sst)	= Die Maus kann sich fast nicht mehr bewegen, in Rückenlage gebracht, sich nicht mehr umdrehen.
#####	moribund (mor)	= Die Maus ist im Verenden.
#	+	= verendet
∅	o	= keine tetanischen Symptome wahrnehmbar

Die Symbole werden in den Tabellen 5, 6 u. 7 verwendet. Der frühere oder spätere Eintritt der Symptome hängt von der Toxizität des Toxins ab.

Als Versuchstiere benutzte ich etwa 20 g schwere männliche und weibliche weiße Mäuse des Stammes NMRI. Pro Verdünnungsstufe verwendete ich zwei Mäuse. Jede Prüfung eines Toxins wurde zur Sicherung der Ergebnisse mehrere Male wiederholt, insbesondere dann, wenn eine Maus bei einer höheren Verdünnungsstufe ohne oder nur mit geringen tetanischen Anzeichen verendet war.

Zur Prüfung der Toxizität stellte ich mir von allen Trockentoxinen folgende Verdünnungsstufen her:

Toxinlösung		g Toxin/Impfdosis
I	= $5,5 \cdot 10^{-4}$ g/ml	$2,2 \cdot 10^{-4}$
Ia	= $5,5 \cdot 10^{-5}$ g/ml	$2,2 \cdot 10^{-5}$
II	= $5,5 \cdot 10^{-6}$ g/ml	$2,2 \cdot 10^{-6}$
III	= $5,5 \cdot 10^{-7}$ g/ml	$2,2 \cdot 10^{-7}$

Die Impfdosis der Toxinlösung III ($2,2 \cdot 10^{-7}$ g) entspricht der Toxindosis der Toxinkontrollen bei der Seratestung.

Die Tabelle 5 zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen den Trockentoxinen, die aus Nährmedium I, II bzw. III gewonnen wurden. Die Toxizität der Trockentoxine war bei allen von mir angewandten Methoden der Toxinanreicherung am höchsten, wenn die Toxine aus der reifen Kultur des Nährmediums III konzentriert wurden.

Ich ziehe bei nachfolgender Bewertung nur die Trockentoxine in Betracht, die aus den Nährmedien III und IIIa gewonnen wurden.

Die Übersichtstabellen 6 und 7 zeigen, daß die Toxizität der einzelnen von mir hergestellten Trockentoxine sehr unterschiedlich ist. Es unterscheiden sich nicht nur die Trockentoxine, die mit den von mir angewandten Methoden

Tabelle 5: Vergleich der Auswertung der Trockentoxine, die mit vier verschiedenen Methoden aus den Nährmedien I, II und III angereichert wurden

Anreicherungs- methode	Nährmedium I		Nährmedium II		Nährmedium III	
	Injektions- dosis in g		Tag nach der Injektion			
	1. 2. 3. 4. 5. 6.	1. 2. 3. 4. 5. 6.	1. 2. 3. 4. 5. 6.	1. 2. 3. 4. 5. 6.	1. 2. 3. 4. 5. 6.	1. 2. 3. 4. 5. 6.
Ammonium- sulfat	2,2 . 10 ⁻⁴	+++	#		#	
	2,2 . 10 ⁻⁵	+	#		#	
	2,2 . 10 ⁻⁶			+		#
	2,2 . 10 ⁻⁷					#
MASCHMANN	2,2 . 10 ⁻⁴	++		+		#
	2,2 . 10 ⁻⁵					#
	2,2 . 10 ⁻⁶					#
	2,2 . 10 ⁻⁷					Ø
LEVINE/ STONE	2,2 . 10 ⁻⁴	+		+	#	
	2,2 . 10 ⁻⁵				#	
	2,2 . 10 ⁻⁶					#
	2,2 . 10 ⁻⁷					+++
PENFOLD	2,2 . 10 ⁻⁴			#	#	
	2,2 . 10 ⁻⁵					#
	2,2 . 10 ⁻⁶					Ø
	2,2 . 10 ⁻⁷					Ø

Symptome:

+ = Spur
++ = leicht
+++ = deutlich

+++ = stark
++ = tot
Ø = keine Erscheinungen

Tabelle 6: Auswertung der Trockentoxine, die mit vier verschiedenen Methoden aus dem Nährmedium III angereichert wurden

Anreicherungs- methode	Nährmedium III									
	10.6.70*					28.6.70*				
	Injektions- dosis in g					Tag nach der Injektion				
	1.	2.	3.	4.	5. 6.	1.	2.	3.	4.	5. 6.
Ammonium- sulfat	2,2 . 10 ⁻⁴	#				#			#	
	2,2 . 10 ⁻⁵	#				#			#	
	2,2 . 10 ⁻⁶		#				#			#
	2,2 . 10 ⁻⁷			#				#		#
MASCHMANN	2,2 . 10 ⁻⁴		#			#				#
	2,2 . 10 ⁻⁵		#			#				#
	2,2 . 10 ⁻⁶				///					
	2,2 . 10 ⁻⁷				Ø		#			Ø
LEVINE/ STONE	2,2 . 10 ⁻⁴	#				#			#	
	2,2 . 10 ⁻⁵	#				#			#	
	2,2 . 10 ⁻⁶		#				#			#
	2,2 . 10 ⁻⁷			#				///		#
PENFOLD	2,2 . 10 ⁻⁴	#				#			#	
	2,2 . 10 ⁻⁵		#				#			Ø
	2,2 . 10 ⁻⁶			#				Ø		Ø
	2,2 . 10 ⁻⁷				///			Ø		Ø

* = Herstellungsdatum der Trockentoxine

Tabelle 7: Auswertung der Trockentoxine, die mit vier verschiedenen Methoden aus dem Nährmedium IIIa angereichert wurden

Anreicherungs- methode	Nährmedium IIIa									
	Injektions- dosis in g		21.10.70*		30.10.70*		Tag nach der Injektion			
	1. 2. 3. 4. 5. 6.	1. 2. 3. 4. 5. 6.	1. 2. 3. 4. 5. 6.	1. 2. 3. 4. 5. 6.	1. 2. 3. 4. 5. 6.	1. 2. 3. 4. 5. 6.	1. 2. 3. 4. 5. 6.	1. 2. 3. 4. 5. 6.	1. 2. 3. 4. 5. 6.	7.11.70*
Ammonium- sulfat	2,2 . 10 ⁻⁴	#	#	#	#	#	#	#	#	
	2,2 . 10 ⁻⁵	#	#	#	#	#	#	#	#	
	2,2 . 10 ⁻⁶	#	#	#	#	#	#	#	#	
	2,2 . 10 ⁻⁷	#	#	#	#	#	#	#	#	
MASCHMANN	2,2 . 10 ⁻⁴	#	#	#	#	#	#	#	#	
	2,2 . 10 ⁻⁵	#	#	#	#	#	#	#	#	
	2,2 . 10 ⁻⁶	#	#	#	#	#	#	#	#	
	2,2 . 10 ⁻⁷	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
LEVINE/ STONE	2,2 . 10 ⁻⁴	#	#	#	#	#	#	#	#	
	2,2 . 10 ⁻⁵	#	#	#	#	#	#	#	#	
	2,2 . 10 ⁻⁶	#	#	#	#	#	#	#	#	
	2,2 . 10 ⁻⁷	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
LENFOLD	2,2 . 10 ⁻⁴	#	#	#	#	#	#	#	#	
	2,2 . 10 ⁻⁵	#	#	#	#	#	#	#	#	
	2,2 . 10 ⁻⁶	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
	2,2 . 10 ⁻⁷	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	

* = Herstellungsdatum der Trockentoxine

hergestellt wurden, es zeigen auch die Trockentoxine verschiedener Herstellungszeit aber gleicher Herstellungsmethode sehr unterschiedliche Wirksamkeit.

Lediglich die Trockentoxine, die ich mit Hilfe der Ammoniumsulfat-Methode hergestellt habe, zeigten (mit Ausnahme einer Charge) bei jeder Aufbereitung die gleiche Toxizität, die etwa der Wirksamkeit des Behring-Standard-Trockentoxins entsprach. Die anderen Methoden der Konzentration zeigten entweder unbefriedigende oder wechselhafte Ergebnisse.

Daß dies wahrscheinlich nicht am mangelnden Toxingehalt der reifen Kultur lag, zeigte erstens die Toxizität der reifen Kulturbouillon, sie lag jeweils bei 20.000 DLM/ml, und zweitens die Menge des Trockentoxins, gewonnen mit Ammoniumsulfat, sie betrug jeweils etwa 600 mg/1000 ml Kultur, und drittens die Auswertung der durch die Ammoniumsulfat-Methode gewonnenen Trockentoxine, die parallel aus denselben Kulturen gewonnen wurden.

Die Trockentoxine, hergestellt nach Angaben von LEVINE und STONE 1954 zeigten bis zur Toxinlösung II befriedigende Ergebnisse, während die Toxinlösung III nicht befriedigte.

Die Trockentoxine, hergestellt nach Angaben von MASCHMANN 1931, bewirkten bis zur Toxinlösung Ia den Tod der Versuchstiere, jedoch bei Toxinlösung II bzw. III nur noch bei vier bzw. zwei Chargen.

Die Trockentoxine, hergestellt nach Angaben von PENFOLD u. Mitarb. 1941, zeigten die stärksten Schwankungen bezüglich der Toxizität und hatten bei Toxinlösung III keine letale Wirkung mehr.

Das wirksamste Trockentoxin erhielt ich durch Reinigung mit Hilfe der Gelchromatographie und anschließender Kon-

zentration durch Lyophilisation. Das so erhaltene Trockentoxin war um das 4400-fache toxischer als das mit der Ammoniumsulfat-Methode hergestellte Trockentoxin.

Tabelle 8: Auswertung des Trockentoxins, das durch Gel-chromatographie und Lyophilisation gewonnen wurde

Impfdosis	Tag nach der Injektion					
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
$5,0 \cdot 10^{-4}$ g	+					
$5,0 \cdot 10^{-5}$ g	+					
$5,0 \cdot 10^{-6}$ g	+					
$5,0 \cdot 10^{-7}$ g		+				
$5,0 \cdot 10^{-8}$ g		+				
$5,0 \cdot 10^{-9}$ g		+				
$5,0 \cdot 10^{-10}$ g			+			
$5,0 \cdot 10^{-11}$ g					+	
$5,0 \cdot 10^{-12}$ g						o

+ = tot

o = keine Symptome

3. Aufbewahrung und Haltbarkeit der Trockentoxine

Die von mir hergestellten Trockentoxine sowie das Standard-Trockentoxin der Behring-Werke bewahrte ich im evakuierten Exsikkator im Dunkeln bei Zimmertemperatur auf.

Die Trockentoxine kamen somit nur während der Wägungen zur Herstellung der Toxinlösungen mit Luft und Luftfeuchtigkeit in Berührung. Die Trockentoxine hatten mit Aus-

nahme des hochwirksamen, mit Hilfe der Gelfiltration gereinigten Toxins, eine dunkelbraune Färbung.

Die Haltbarkeit von vier verschiedenen Trockentoxinen prüfte ich 6 Monate nach der Herstellung und Aufbewahrung unter den beschriebenen Bedingungen:

Tabelle 9: Auswertung von Trockentoxinen 6 Monate nach ihrer Herstellung

Toxin	Toxinlösung	Tag nach der Injektion					
		1.	2.	3.	4.	5.	6.
1	I	+					
	Ia	+					
	II		+				
	III			+			
2	I	+					
	Ia	+					
	II		+				
	III			+			
3	I	+					
	Ia	+					
	II		+				
	III			+			
4	I	+					
	Ia		+				
	II			+			
	III						dtl

Toxin Nr. 1, 2, 3 = mit Hilfe der Ammoniumsulfat-Methode gereinigte und konzentrierte Trockentoxine

Toxin Nr. 4 = nach Angaben von PENFOLD u. Mitarb. hergestelltes Trockentoxin

+ = tot

dtl = deutliche tetanische Symptome

Die Ergebnisse der Toxinprüfung 6 Monate nach Herstellung der Trockentoxine zeigen, daß es, im Vergleich zu den Ergebnissen der Prüfung auf Toxizität unmittelbar nach Herstellung der Trockentoxine, zu keinem Abfall der Toxizität in diesem Zeitraum gekommen ist.

Wesentlich geringer war die Haltbarkeit des mit Hilfe der Gelfiltration hochgereinigten Toxins. Hierbei fiel die Toxizität, ausgedrückt in letaler Dosis pro Maus, innerhalb von 2 Tagen von $5,0 \cdot 10^{-11}$ g Trockentoxin/Maus auf $5,0 \cdot 10^{-10}$ g/Maus, dann weiter innerhalb von 4 Tagen auf $5,0 \cdot 10^{-6}$ g/Maus. Nach 24 Tagen betrug die letale Dosis $5,0 \cdot 10^{-4}$ g/Maus, d.h. die letale Dosis betrug das 10 Millionenfache des frisch hergestellten Trockentoxins (s. Abb. 5).

4. Aussagen über das Molekulargewicht

Das Molekulargewicht des kristallinen Tetanustoxins wird mit 67.000 angegeben (PILLEMER, WITTLER und GROSSBERG 1946). SALENSTEDT und TIRUNARAYANAN 1966 haben bei der Reinigung von Tetanustoxin mit Hilfe von SEPHADEX-Gel ein Molekulargewicht von über 200.000 festgestellt, sie nahmen dabei ein tetrameres Aggregat des nativen Toxins an.

Um das von mir hergestellte Toxin auf diese angegebenen Werte zu prüfen, gab ich zusammen mit der hochkonzentrierten Toxinlösung gleichzeitig Human-Hämoglobin auf die SEPHADEX-Trennsäule. Das Molekulargewicht für Human-Hämoglobin wird mit 66.700 angegeben (MARTI 1963).

Es war somit zu erwarten, daß das Tetanustoxin und das Hämoglobin in etwa den gleichen Elutionsfraktionen erscheinen würden, allenfalls jedoch nur mit geringen Verschiebungen, die durch die unterschiedliche Struktur beider Proteine und durch das damit möglicherweise unterschiedliche Elutionsverhalten bedingt wären (DETERMANN

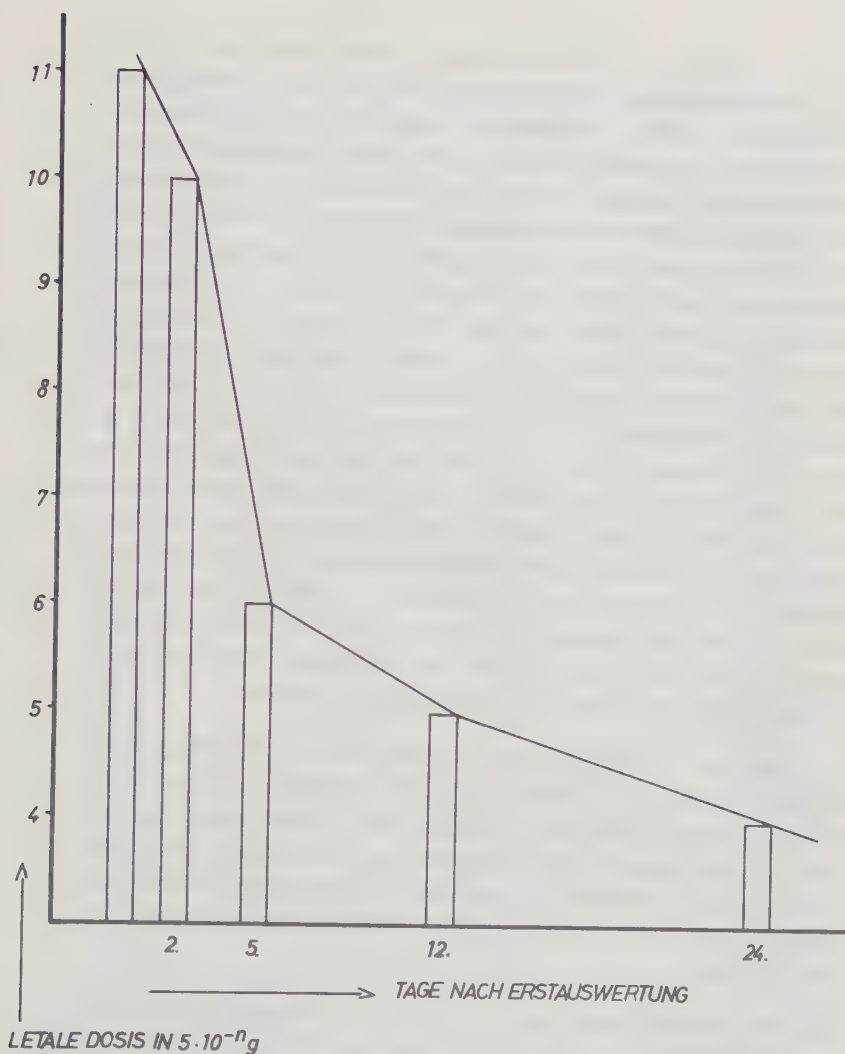


ABB. 5: ABFALL DER TOXIZITÄT DES GELCHROMATOGRAPHISCH GEREINIGTEN UND LYOPHILISIERTEN TROCKENTOXINS

1967 S. 120 ff.). Die Abbildung 6 zeigt das Ergebnis dieses Versuches: das Tetanustoxin und das Human-Hämoglobin erscheinen in klar voneinander abgegrenzten Elutionsfraktionen. Das Versuchsergebnis kann daher folgendermaßen interpretiert werden: da das SEPHADEX-Gel Typ G-150 Moleküle mit einem Molekulargewicht von mehr als 150.000 ausschließt und das Toxin nicht (oder nur in geringen Spuren) in den Ausschlußfraktionen erschien, kann mit Sicherheit ausgesagt werden, daß das von mir hergestellte Toxin kein Molekulargewicht über 150.000 hatte. Andererseits erschienen die toxischen Elutionsfraktionen in einem weiten Abstand zum Hämoglobin, so daß auch hier mit Sicherheit gesagt werden kann, daß das Toxin ein Molekulargewicht von über 100.000 hatte (STÖFFLER 1970). Man kann wohl annehmen, daß das Toxin in der Trennsäule als dimeres Aggregat vorlag. Genaue Aussagen über das Molekulargewicht des Aggregates können mit diesem Versuch nicht gemacht werden, da hierzu neben dem Human-Hämoglobin noch weitere Proteine oder andere Stoffe mit definiertem Molekulargewicht als Eichsubstanzen hätten verwandt werden müssen.

Die Autoren SALENSTEDT und TIRUNARAYANAN 1966, die ein Molekulargewicht von über 200.000 festgestellt und ein tetrameres Aggregat der Toxinmoleküle angenommen hatten, geben ferner an, daß das Tetanustoxin im natürlichen Zustand möglicherweise als großes (tetrameres) Molekül in Erscheinung tritt und sich erst während der Präzipitation aufspaltet.

Unter Umständen spielten bei meinen Versuchen, die ein dimeres Aggregat vermuten ließen, die Konzentration bzw. die Verdünnung der auf die SEPHADEX-Säule aufgetragenen Toxinlösung eine Rolle, wie das für das Hämoglobin und β -Lactoglobulin festgestellt wurde. Das Molekulargewicht beider Substanzen fiel mit zunehmender Verdünnung ab und nahm schließlich als Grenzwert die Hälfte des allgemein akzeptierten Wertes an (ANDREWS 1964).

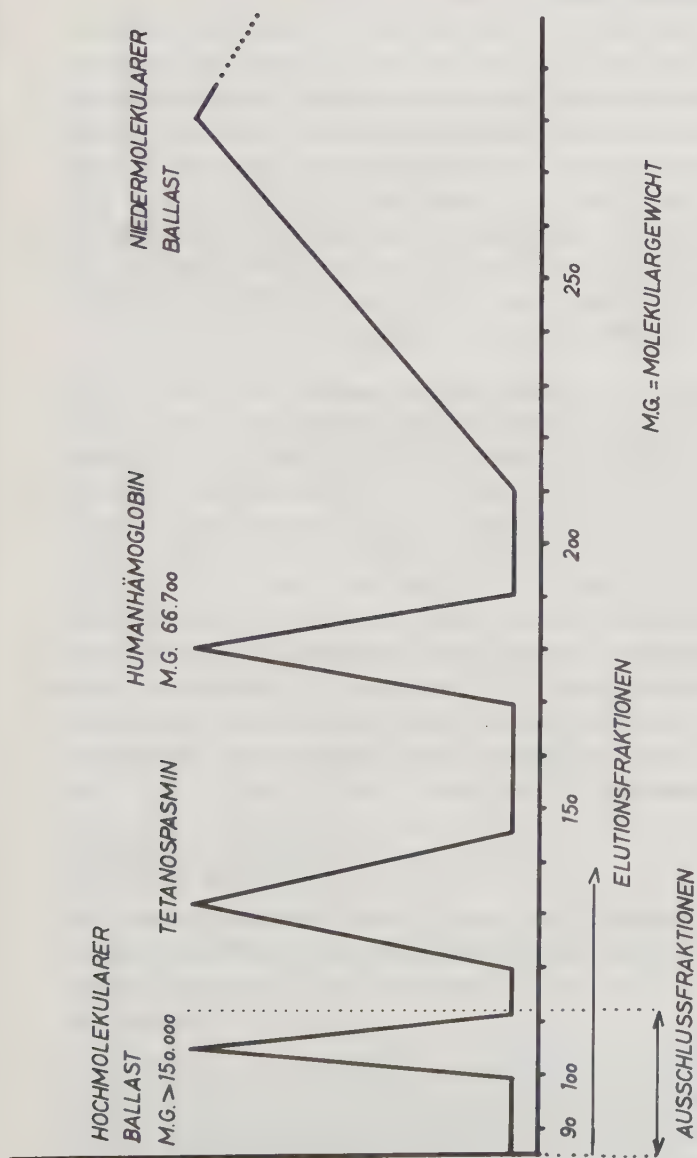


ABB. 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ELUTIONSVERHALTENS DES TETANOSPASMINS, DES HUMANHÄMOGLOBINS UND DER BALLASTSTOFFE DER VORGEREINIGTEN TOXINLÖSUNG

B e s p r e c h u n g

Die Bedeutung eines Tetanusstammes für die Toxinproduktion ist groß. Jeder Stamm produziert ein ihm eigentümliches Proteingemisch, dessen relative Anteile genetisch bedingt sind. So produziert z.B. der von MUELLER und MILLER 1945 isolierte, nichtsporenbildende Harvard-Stamm relativ viel Tetanospasmin und wenig makro- und mikromolekulare Ballaststoffe, während der Wellcome-Stamm G.S. 761 relativ hohe Anteile an Ballaststoffen produziert. LARGIER 1956 stellte dies durch elektrophoretische Untersuchungen fest.

Die unterschiedliche Tetanospasminproduktion (bei gleichem Medium und gleichen Kultivierungsbedingungen) drückte sich auch in der Toxizität des Kulturfiltrates aus: der Harvard-Stamm erzeugte eine DLM von $4,5 \cdot 10^6$ /ml Filtrat gegenüber einer DLM von $0,9 \cdot 10^6$ /ml Filtrat beim Wellcome-Stamm (LARGIER 1956).

Der Stamm Dessau, der für die vorliegenden Untersuchungen verwendet wurde, ist mit 20.000 DLM/ml Kulturfiltrat nur ein schwacher Toxinbildner, er liegt mit diesem Wert etwa in der Größenordnung der Stämme *196 A (30.000 DLM/ml) und *196 B (10.000 DLM/ml), die PILLEMER 1946 verwendet hatte (s. Tabelle 10).

Hierbei ist jedoch zu bedenken, daß der Stamm Dessau (im Gegensatz zu den Stämmen *196 A und *196 B) in proteinfreiem Medium kultiviert wurde. Dies hat eine Abnahme der DLM-Werte (die mit proteinhaltigem Nährmedium erreicht werden) zur Folge, die bis zu 50 % betragen kann (STONE 1953).

Um gleichmäßige Ergebnisse zu erzielen, ist unbedingt darauf zu achten, daß alle Kulturchargen mit gleichartigem Inoculum beimpft werden. MUELLER und MILLER 1945, 1948 b, 1954 empfehlen ein 24-stündiges Inoculum, das

anaerob bebrütet wird. Nach 24 Stunden sind in der Regel auch bei sporulierenden Stämmen noch keine Sporen ausgebildet, außerdem ist das Inoculum weitgehend einheitlich, da sich die meisten Keime in der gleichen Generation befinden. Ein Inoculum, das neben vegetativen Keimen Sporen enthält oder das nur Sporen enthält, ist für die Beimpfung wenig geeignet bzw. unbrauchbar.

Ich konnte feststellen, daß ein Nährmedium, welches mit einem solchen Inoculum beimpft worden war, reichlichen Keimbewuchs erst sehr verzögert, d.h. erst etwa zwei Tage nach Beimpfung zeigte. Teilweise trat ein Wachstum überhaupt nicht mehr ein.

Dies findet seine Erklärung wahrscheinlich im Wiederanstieg des Sauerstoffpartialdruckes im Nährmedium, der nach Sterilisierung oder Autoklavierung (die mit einer Austreibung der Luft und somit des Sauerstoffs aus dem Nährmedium einhergehen) so niedrig ist, daß er eine Kultivierung von *Clostridium tetani* und anderen Clostridien ohne Luftabschluß ermöglicht. LEV 1956 hatte mit seinen Untersuchungen festgestellt, daß der Initial-Sauerstoffpartialdruck des Nährmediums am Beginn der Generationsphase wichtiger ist als die Anwesenheit von Wachstumsstimulantien. Nach 24 Stunden ist der Sauerstoffpartialdruck im Nährmedium bei aerober Kultivierung schon wieder so hoch, daß eine nach Auskeimung der Sporen beginnende Keimvermehrung erschwert oder unmöglich ist.

Um Tetanusstämme, die in leber- oder fleischbouillonhaltigen Nährmedien kultiviert wurden, in proteinfreien Nährmedien zur Vermehrung zu bringen, muß man sie an dieses Nährmedium adaptieren.

STONE 1953 adaptierte den von MUELLER und MILLER 1945 isolierten Harvard-Stamm an ein proteinfreies Medium, indem er ihn abwechselnd in Thioglykolat-Bouillon und Mueller-Miller-Medium (von 1951) kultivierte, wobei er die Menge

des Herzwassers sukzessive reduzierte.

Der Stamm Dessau konnte von mir schon durch fünf Passagen an das proteinfreie Nährmedium von LATHAM, BENT und LEVINE 1962 adaptiert werden.

Es gelang mir jedoch nicht, den Stamm Z 28, den die Behring-Werke für ihre Toxinproduktion benutzen, in der mir zur Verfügung stehenden Zeit (in ca. 4 Wochen mit 8 Passagen) an das Medium von LATHAM u. Mitarb. 1962 genügend zu adaptieren. Keimwachstum und Toxinbildung blieben unzureichend, so daß ich die Bearbeitung dieses Stammes zurückstellte.

Welchen Einfluß die Zusammensetzung des Nährmediums, die Stammart und die Kultivierungsbedingungen auf die Toxinproduktion haben, ist aus nachfolgender Tabelle 10 zu ersehen.

Die verschiedenen Autoren geben bei der Beschreibung ihres Nährmediums an, ob ein Bestandteil essentiell bzw. wachstumsfördernd ist. Am meisten diskutiert wurden die Mengen des Caseinpeptons, des Herzwassers (bzw. Fleischwassers), des Vitamins B₁₂ und die Menge sowie die Form der Eisenzugabe.

LATHAM, BENT und LEVINE 1962 stellten eine Beziehung zwischen den Mengen von Caseinpepton und Eisen einerseits und der Toxizität des Kulturfiltrates andererseits fest und gaben als optimale Mengen 24,0 g Caseinpepton und 32,0 mg FeCl₃ · 6 H₂O pro 1 Liter Medium an. Eine Vermehrung oder Verminderung dieser Mengen führte nicht mehr zu einer Erhöhung der Toxizität des Kulturfiltrates.

Ich erreichte mit den angegebenen Mengen ebenfalls während einer längeren Versuchsserie zufriedenstellende Ergebnisse, bis ich eine andere HerstellungschARGE des Caseinpeptons zur Zubereitung des Nährmediums benutzen mußte. Dies hatte zur Folge, daß sich das so zusammengesetzte, be-

Tabelle 10: Übersicht über die von verschiedenen Autoren benutzten Nährmedien und Tetanusstämme und die damit erreichten DLM-Werte

Autor	Jahr	Medium	Cl.tetani-Stamm	DLM/ml
PICKETT, HOEPRICH u. GERMAIN	1945	Mueller-Miller-M. von 1945	Harvard	800.000
PILLEMER, WITTLER u. GROSSBERG	1946	Mueller-Miller-M. von 1945	Harvard	200.000
PILLEMER	1946	Mueller-Miller-M. von 1945	Harvard *196 A *196 B	400.000 30.000 10.000
MUELLER u. MILLER	1947	Mueller-Miller-M. von 1945	Harvard	800.000
MUELLER u. MILLER	1954	Mueller-Miller-M. von 1954	Harvard	1.400.000
STONE	1953	eigenes protein- freies M.	Harvard (Variante)	500.000
LATHAM, BENT u. LEVINE	1962	eigenes protein- freies M.	Harvard (Variante)	600.000
KOCH u. KAPLAN	1953	eigenes Medium	Harvard (Variante)	180.000
eigene Unter- suchg.	1970	Medium v. Latham u. Mitarb.1962, leicht modif.	Dessau	20.000
KOCH und KAPLAN 1953 sowie LARGIER 1955 wandten zur Gewinnung von Tetanustoxin die Cellophanbeutel-Methode an, bei der sich die Tetanuskultur in einem Cellophanbeutel befindet, der in das Nährmedium eingetaucht wird. Sie erreichten außerordentlich hohe Toxinwerte:				
KOCH u. KAPLAN	1953	eigenes Medium	Harvard (Variante)	14.000.000
LARGIER	1956	eigenes Medium	Harvard Wellcome	4.500.000 900.000

impfte Nährmedium innerhalb von 24 Stunden infolge starker Eisensulfid-Kolloidbildung schwärzte. Mir gelang es, nach Ausschaltung anderer Ursachen, wie Temperaturschwankung oder bakterieller Verunreinigungen, nur durch Reduzierung der Menge des Eisen-III-Chlorids bei gleichzeitiger Erhöhung der Kobaltmenge das Auftreten dieses Phänomens, das zu toxinarmen Kulturfiltraten führte, zu verhindern.

Die Zugabe von Kobalt wählte ich an Stelle von Vitamin B₁₂, das nach KAUFMAN und HUMPHRIES 1958 für die von ihnen untersuchten Tetanusstämme nicht essentiell war und in einer Menge von 0,006 µg Vitamin B₁₂/ml Medium das Wachstum auch nicht indirekt durch Erniedrigung des Sauerstoffpartialdruckes durch das im Vitamin B₁₂ vorhandene Kobalt fördern konnte.

LEV 1956 stellte bei seinen Untersuchungen fest, daß die Zugabe von 4 µg Co⁺⁺/ml Nährmedium den Sauerstoffpartialdruck (E_h) eines nicht erhitzten Mediums von -175 mV auf -255 mV erniedrigt und somit reduzierende, d.h. für die Kultivierung des Tetanuskeimes günstige Bedingungen schafft.

KAUFMAN und HUMPHRIES 1958 untersuchten die Wachstumsfaktoren für vier Tetanusstämme und fanden, daß Biotin, Pyridoxin, Nikotinsäure, Ca-Pantothenat, Folsäure und Uracil essentielle Bestandteile der Nährmedien sind, ohne die ein Wachstum nicht stattfindet.

Alle diese Substanzen sind auch Bestandteile der von mir benutzten Nährmedien II, III und IIIa, ausgenommen das Vitamin Folsäure. Jedoch ist im Caseinpepton, das ein Produkt aus der Milch ist, die 50% Folsäure pro Liter enthält (RAUEN 1956), wahrscheinlich noch Folsäure in den geringen Spuren enthalten, die für eine Keimvermehrung unerlässlich sind (KAUFMAN und HUMPHRIES: 0,006 µg/ml Medium). KAUFMAN und HUMPHRIES 1958 arbeiteten mit vitaminfreien Caseinprodukten.

Bei ihren Untersuchungen fanden sie weiterhin, daß mehrere der nicht essentiellen Bestandteile ihrer Nährmedien für die vier von ihnen überprüften Tetanusstämme nicht in dem gleichen Maße wachstumsfördernd wirkten. Sie sind der Meinung, daß jeder Tetanusstamm eine andere Nährbodenzusammensetzung benötigt.

Die Bestimmung der Toxizität des Kulturfiltrates sowie des Trockentoxins kann in vitro und in vivo vorgenommen werden. Bei der in vitro durchgeführten Flockulationsmethode, deren positive Reaktion ein Zonenphänomen erkennen läßt, kommt es häufig zum Auftreten mehrerer Reaktionszonen, die dann nur schwer entscheiden lassen, welche Zone mit dem Antigen Tetanospasmin korrespondiert.

Das Tetanospasmin ist nicht das einzige Antigen, das flockuliert. Man erklärt das Auftreten mehrerer Zonen durch das Vorhandensein nicht spezifischer Antigene, wie des Geißelantigens und anderer nicht definierter Antigene (REGAMEY 1959).

Das Auftreten mehrerer Reaktionszonen kann zwar durch Wahl eines sehr spezifischen Serums weitgehend verhindert werden, doch ist bei alleiniger Anwendung der Flockulationsmethode außerdem zu bedenken, daß manche Toxine überhaupt nicht flockulieren.

So stellten z.B. KOCH und KAPLAN 1953 mit einem sehr einfachen Nährmedium ein Toxin mit der 180.000-fachen DLM pro ml Kulturfiltrat her, das aber nicht flockulierte.

Es ist zwar möglich, ein nicht flockulierendes Toxin durch Vermischen mit einem sog. "Hilfstoxin", welches leicht und schnell flockuliert, ebenfalls zur Flockulation zu bringen (AMBERG 1946), doch entschied ich mich angesichts der erläuterten Unsicherheiten für die Auswertung des Toxins im Mäuseversuch, da dieser einfach in der Durchführung ist und verhältnismäßig sichere Ergebnisse bringt.

Ich verwendete im Mäuseversuch pro Verdünnungsstufe lediglich zwei Mäuse, wiederholte aber zur Sicherung der Ergebnisse die Auswertung mehrere Male.

Hierbei zeigte sich, daß die gewählte Anzahl der Versuchstiere nicht zu gering war, da nicht lediglich der Tod eines Versuchstieres, der auch durch andere Einflüsse verursacht sein konnte, bewertet wurde, sondern der Eintritt des Todes nach Ablauf einer Reihe immer gleichartiger Symptome, die sich in (von der Injektionsstelle) fortschreitender Lähmung zeigten.

Die verschiedenen symptomatischen Lähmungserscheinungen traten jeweils bei den Mäusen, denen die gleiche Menge Toxin injiziert worden war, etwa gleichzeitig in etwa gleicher Stärke ein. Lediglich beim Überleben der ersten drei Tage (bei einer Beobachtungsdauer von sechs Tagen) trat der Tod der Versuchstiere dann - bei entsprechender Wirksamkeit des Toxins - häufig mit einem Unterschied von einem Tag ein.

Die Ergebnisse aus dem Tierversuch sind nicht ohne weiteres mit den Untersuchungen anderer Autoren zu vergleichen, da nicht alle Autoren das Gewicht der Mäuse, die Art der Applikation des Toxins und die Beobachtungsdauer angeben. Das angegebene Gewicht schwankt zwischen 15 und 20 g, die Applikation ist subkutan, intramuskulär oder intravenös möglich, die Beobachtungsdauer beträgt, wenn angegeben, 4 - 6 Tage. Zu diesen variablen Faktoren kommen als mögliche Einflüsse auf die Versuchsergebnisse noch in Frage der Mäusestamm, das Geschlecht der Mäuse und ihr physiologischer Zustand, die Jahreszeit sowie die umgebende Temperatur und die Ernährung.

Dem zweiten von dem Cl. tetani produzierten Toxin, dem Tetanolysin, wird bei der Diskussion über das Tetanospasmin wenig Beachtung geschenkt. Versuche zur Isolierung

und Gewinnung von Tetanolysin sind nur von HARDEGREE 1965 beschrieben.

Diese Außerachtlassung des Tetanolysins hat ihren Grund ganz offenbar in der im Gegensatz zum Tetanospasmin relativ geringen toxischen Wirkung und geringen Menge im Kulturfiltrat.

Das Tetanolysin wird, im Gegensatz zum Spasmin, das erst nach Autolyse der Keime freigesetzt wird, während der Phase aktiven Wachstums der Keime in das umgebende Nährmedium abgegeben und wird dann sehr bald inaktiviert, so daß es in älteren Kulturen, die hohe Tetanospasmin-Konzentration zeigen, nicht mehr gefunden wird. Dieses Verschwinden ist nicht nur eine Folge der natürlichen Labilität des Tetanolysins, sondern einer reversiblen Oxydation (WILLIS 1969).

Tetanolysin ist sehr empfindlich gegenüber Temperatureinwirkung, Säuren und Oxydantien. In vitro wird die Aktivität des Tetanolysins schon durch normales Serum und Sterine (Cholesterin, Ergosterin u.a.) gehemmt.

Bei Hämolyseversuchen mit Blutagarplatten konnte ich weder bei Verwendung des mit dem Stamm Dessau hergestellten Kulturfiltrates, noch mit dem 10-fach konzentrierten Filtrat eine Hämolyse beobachten. Lediglich bei Versuchen an 4 - 6 Wochen alten Küken traten u.a. an Kamm und Krallen sichtbare hämolytische Erscheinungen auf.

Hierbei ist allerdings zu bemerken, daß den Küken die 30.000-fache DLM Tetanustoxin einer Maus, bezogen auf relatives Körpergewicht, injiziert wurde und daß die Blutkörperchen des Huhnes besonders empfindlich gegenüber Tetanolysin sind (REGAMEY 1959).

Die Höhe der Tetanustoxinmenge, die den Küken bei diesem Versuch injiziert wurde, erklärt sich aus der hohen

Unempfindlichkeit des Huhnes gegenüber dem Tetanospasmin. Das Huhn ist von allen Haus- und warmblütigen Versuchstieren dasjenige mit der größten natürlichen Resistenz gegenüber Tetanospasmin:

Tabelle 11: Übersicht über die Tetanospasminmengen, die bei den aufgeführten Tierarten den Tod verursachen; bezogen auf relatives Körpergewicht (nach SMITH und HOLDEMAN 1968)

Pferd	1	Meerschweinchen	72
Mensch	1*	Hund	600
Ziege	6	Katze	7.200
Maus	12	Taube	12.000
Kaninchen	24	Huhn	360.000
Affe	48		

* geschätzt

Die pathologische Bedeutung des Tetanolysins ist bei natürlicher Infektion sehr gering, da das normale Serum der meisten Tierarten genügend Cholesterin zur Inaktivierung des Tetanolysins enthält (SMITH und HOLDEMAN 1968), obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, daß das Tetanolysin für das Auftreten von Anämien und Herzkomplicationen verantwortlich ist (HARDEGREE 1965).

Nach VAN HEYNINGEN 1954 hat das Tetanolysin neben seiner hämolytischen auch noch kardiotoxische Wirkung. Dies stimmt auch mit den Beobachtungen überein, die an versuchsweise tetanisierten und nach dem Tode seziierten Küken gemacht wurden: es wurde u.a. eine Myodegeneratio cordis festgestellt, die sich pathologisch-anatomisch in schlaffer Herzmuskulatur und dünnen Herzkammerwänden äußerte. Pathologisch-histologisch waren zahlreiche Herzmuskelfaser-Nekrobiosen, stellenweise mit Myolyse, zu erkennen (HILDEBRAND 1971).

HARDEGREE 1965 konnte das Tetanolysin mit Hilfe der Gelchromatographie weitgehend vom Tetanospasmin abtrennen,

jedoch ging die hämolytische Aktivität bei dieser Prozedur größtenteils verloren, so daß der Wirkungsgrad zur Gewinnung aktiven Tetanolysins auch bei dieser Methode gering war. Durch Zusatz von Reduktionsmitteln konnte der Wirkungsgrad nicht erhöht werden.

Das Tetanolysin wird bei der Gelchromatographie später eluiert als das Tetanospasmin, so daß, gemäß der Theorie der Gelchromatographie, HARDEGREE annimmt, daß das Tetanolysin-Molekül kleiner ist als das Tetanospasmin-Molekül.

Bei der Vielzahl der von verschiedenen Autoren angewandten Verfahren zur Konzentration und Reinigung entschied ich mich wegen der verhältnismäßig leichten Durchführbarkeit für die Methoden folgender Autoren: MASCHMANN 1931, LEVINE und STONE 1951, PENFOLD, TOLHURST und WILSON 1941, ferner für die Ammoniumsulfat-Methode und die Gelchromatographie.

Die Methode zur Kristallisation des Tetanustoxins von PILLEMER, WITTLER und GROSSBERG 1946 erfordert ein Arbeiten bei Temperaturen zwischen -4° bis -8° C und damit einen großen technischen Aufwand.

Die Methoden nach RAYNAUD, NISMAN und PRUDHOMME 1950 und RAYNAUD 1951 setzen das Tetanustoxin direkt aus den Tetanuskeimen durch Anwendung von Ultraschall bzw. durch Extraktion frei. Diese Methoden erfordern sehr große Mengen Tetanuskultur, um aus den zentrifugierten Tetanuskeimen genügend Toxinmengen zu gewinnen. Das Trockengewicht des zellhaltigen Zentrifugates aus 2 l siebentägiger Tetanuskultur betrug bei meinen Untersuchungen nur etwa 215 mg.

Auch die Ultrafiltration benötigt erhebliche Mengen Tetanuskultur. So gehen SALENSTEDT und TIRUNARAYANAN 1966 von etwa 140 l Kultur aus, die sie durch zweimalige Ultrafiltration auf 20 - 50 ml einengen. Die DLM ihrer Konzentrate geben sie mit 500.000 - 1.000.000/ml an. Ich erreichte mit der Konzentration durch Ammoniumsulfat aus 2 l

Tetanuskultur den Wert von 200.000 DLM/ml bei Einengung auf 40 ml.

Die von mir angewandten Verfahren hatten, bis auf die Ammoniumsulfat-Methode und die Gelchromatographie, wechselhafte Ergebnisse, wobei das Verfahren nach LEVINE und STONE 1951, im Gegensatz zu dem von MASCHMANN 1931 und PENFOLD u. Mitarb. 1941, noch die gleichmäßigsten Ergebnisse brachte.

MASCHMANN 1931 wendete nach der fraktionierten Ausfällung mit Ammoniumsulfat noch die Adsorption des Toxins an Ton-erde mit nachfolgender Elution an und erreichte damit ein hochwertiges Toxin. Bei meinen Untersuchungen konnte ich nach Adsorption und Elution kein Toxin zurückgewinnen.

Die verschiedenen Methoden der Fällung mit Ammoniumsulfat oder die Fällung mit Kochsalz und Essigsäure und die Ultrafiltration sind weniger als Methoden zur Reinigung als zur Konzentration anzusehen, da nicht nur das Tetanospasmin gefällt bzw. bei der Ultrafiltration zurückgehalten wird, sondern auch andere auf diese Weise fällbare Stoffe, mögen sie nun Eiweiße sein oder nicht. Lediglich Salze, Zucker und andere dialysierbare Stoffe werden entfernt.

Wie die Gelchromatographie zeigt, bildet das Tetanospasmin nur den kleinsten Anteil der Stoffe, die im Präzipitat, das durch die Ammoniumsulfat-Fällung gewonnen wird, oder die im Konzentrat nach Ultrafiltration enthalten sind (HARDEGREE 1965, SALENSTEDT und TIRUNARAYANAN 1966, ROBB 1967).

Die Gelchromatographie stellt derzeit das beste und schonendste Verfahren zur Reinigung und Isolierung größerer Mengen Tetanospasmin dar und bildet für Struktur- und andere Feinanalysen des Tetanospasmins eine wertvolle Ergänzung.

Auch für die Impfstoffherstellung ist dieses Verfahren

nutzbar, da andere Proteine und Substanzen, die allergische Reaktionen herbeiführen könnten, weitgehend abgetrennt werden.

Zur Herstellung von Trockentoxin, das zur Feststellung der Antitoxinwerte im Serum immunisierter Tiere oder Menschen dienen soll, ist dieses Verfahren allerdings wenig geeignet, da das hochgereinigte Toxin zu schnell seine Aktivität verliert.

Bei der Reinigung mit der Gelchromatographie spielt es keine Rolle, ob in der zu reinigenden Ausgangsflüssigkeit viel oder wenig Tetanospasmin vorhanden ist, man erhält immer ein gereinigtes Toxin.

Bei der Ammoniumsulfat-Methode, die das Kulturfiltrat etwa 10-fach konzentriert, ist es wesentlich, ob der Stamm, den man zur Toxinproduktion benutzt, verhältnismäßig viel oder wenig Tetanospasmin produziert, da das Spasminprotein im Trockentoxin wieder etwa in dem Verhältnis zu den Ballastproteinen vorhanden ist wie im Kulturfiltrat.

Die Herstellung von Trockentoxin mit der Konzentration durch Ammoniumsulfat ist gegenüber der Ultrafiltration durch den Verbrauch von etwa 0,7 kg Ammoniumsulfat (Reinheitsgrad pro analysi) für 1 l Kulturfiltrat recht teuer. Bei der Ultrafiltration beschränken sich die Kosten für die Verarbeitung großer Mengen Kulturfiltrat im wesentlichen auf den Ersatz der Filtermembranen und den Stromverbrauch für Flüssigkeits- und Vakuumpumpen.

Mehrere Autoren stellten bei ihren Untersuchungen fest, daß die Mengen Tetanus-Antitoxin, die zur Neutralisation des Tetanustoxins benötigt wurden, bei Versuchen in vitro und in vivo verschieden groß waren. FRIEDEMANN¹⁹⁴⁷ nahm daher an, daß die letale Dosis nicht nur von der Zahl der Moleküle pro ml abhängig ist, sondern auch von der jeweiligen Toxizität der Tetanustoxin-Moleküle.

VAN HEYNINGEN 1950 vermutete, daß das Tetanustoxin-Molekül entweder unterschiedlicher Dimension ist oder daß es sich an ein anderes Molekül anzulagern vermag. Die unterschiedliche Größe der Moleküle mußte infolgedessen auch andere biochemische Eigenschaften zur Folge haben.

Diese Hypothese konnte durch die Beobachtungen von ZUGER, HOLLANDER und FRIEDEMANN 1939 gestützt werden, die bemerkten, daß z.B. verschiedene Chemikalien oder Organextrakte in der Lage waren, die Wirkung des Tetanustoxins zu potenzieren.

PILLEMER und Mitarb. 1948 sowie LARGIER und JOUBERT 1956 berichten von einem atoxischen Dimer, das sich innerhalb weniger Tage bei 4° C spontan bildete. RAYNAUD u. Mitarb. 1960 beobachteten ebenfalls ein Dimer, das sich nach dreiwöchiger Aufbewahrung toxinhaltiger Flüssigkeit bei 4° C gebildet hatte. Diese Beobachtungen können durch meine Versuche dahingehend ergänzt werden, daß sich das von mir hergestellte Toxin bei der Gelchromatographie auch als Dimer darstellte. Die Versuche wurden im Kältelabor bei 4° C ausgeführt.

SALENSTEDT und TIRUNARAYANAN 1966 ermittelten bei ihren gelchromatographischen Untersuchungen ein Molekulargewicht von über 200.000 und nahmen ein tetrameres Toxinaggregat an. Die gelchromatographischen Versuche wurden auch hier bei einer Temperatur von 4° C durchgeführt.

Temperaturen um 5° C scheinen mithin die Aggregatbildung zu begünstigen, wenn nicht zu veranlassen.

Die Aggregatbildung ist reversibel. RAYNAUD u. Mitarb. 1960 konnten durch Behandlung mit Cystein und Natriumjodazetat das Dimer aufspalten, und sie erhielten das immer noch toxisch aktive Tetanustoxin-Monomer.

Trotz der unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Autoren ist zu vermuten, daß alle Tetanusstämme, sofern

sie überhaupt Toxin produzieren, qualitativ identisches Tetanospasmin erzeugen. Die wesentlichen Unterschiede sind wohl im quantitativen Verhältnis von Tetanospasmin und Ballaststoffen zu suchen.

LARGIER 1956 führte parallele Untersuchungen mit dem Harvard-Stamm und dem Stamm Wellcome G.S. 761 durch. Er fand für das Tetanospasmin beider Stämme gleiches Molekulargewicht, gleiche Wanderungsgeschwindigkeit bei der Elektrophorese und gleiches Verhalten bei Neutralisations- und Flockulationsversuchen. Der wesentliche Unterschied bestand in der Fähigkeit des Harvard-Stammes, außerordentlich große Mengen Tetanospasmin zu produzieren im Verhältnis zu einer geringen Menge an Ballaststoffen.

Z u s a m m e n f a s s u n g

1. Die Nährmedien von MUELLER und MILLER aus den Jahren 1947 (Nährmedium I) und 1954 (Nährmedium II) sowie das proteinfreie Nährmedium der Autoren LATHAM, BENT und LEVINE aus dem Jahre 1962 (Nährmedium III) wurden auf ihre Eignung zur Toxinproduktion mit dem Clostridium tetani, Stamm Dessau, geprüft.

Der Stamm Dessau, der vor Beginn der Versuche auf Leber-Leber-Bouillon kultiviert worden war, konnte an das proteinfreie Nährmedium von LATHAM u. Mitarb. adaptiert werden.

2. Das Nährmedium von LATHAM u. Mitarb. (Nährmedium III) wurde zur Vermeidung übermäßiger Eisensulfid-Kolloidbildung geringfügig in der Weise geändert, daß der Eisengehalt vermindert, der Kobaltgehalt vermehrt wurde (→ Nährmedium IIIa).
3. Mit den Nährmedien III und IIIa konnten höhere Toxinwerte erreicht werden als mit den Nährmedien I und II.
4. Zur Beimpfung der Nährmedien wurde ein 18 - 24-stündiges Inoculum verwendet.

Die Bebrütung der Kulturgefäße erfolgte bei 35° C ohne Luftabschluß im Wasserbad, das die Temperaturschwankungen, welche die Toxinproduktion drosseln, weitgehend vermindert.

5. Die Trockentoxingewinnung wurde nach Angaben der Autoren MASCHMANN 1931, PENFOLD u. Mitarb. 1941 sowie LEVINE und STONE 1953 durchgeführt. Außerdem wurde die Ammoniumsulfat-Methode sowohl allein als auch in Kombination mit der Gelchromatographie angewandt.

6. Der Stamm Dessau zeigte mäßige, aber bei Kultivierung mit dem Nährmedium IIIa ausreichende Toxinbildung und brachte bei Anwendung der Ammoniumsulfat-Methode ein Trockentoxin, das dem Behring-Standard-Trockentoxin in der Wirksamkeit gleichstand.
7. Bei Anwendung der Gelchromatographie konnte ein hochwertiges Trockentoxin hergestellt werden, das noch in der geringen Menge von $5 \cdot 10^{-11}$ g für eine Maus von 20 g tödliche Wirkung besaß.

Verzeichnis benutzter Reagenzien

1. Ammoniumsulfat, z.Analyse	Merck Art.	6404
2. D(+)-Biotin, f.biochem.Zwecke	Merck Art.	1643
3. Calcium-D(+)-pantothenat	Merck Art.	500157
4. L(-)-Cystin	Merck Art.	2836
5. Eisen (Ferrum reductum) pro analysi	Merck Art.	3819
6. Eisen(III)-chlorid, krist.rein	Merck Art.	3946
7. D(+)-Glucose (Monohydrat) f.d.Bakteriologie	Merck Art.	8342
8. Kaliumdihydrogenphosphat krist.reinst	Merck Art.	4871
9. Kobalt(II)-chlorid, reinst	Merck Art.	2533
10. Magnesiumsulfat, z.Analyse ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	Merck Art.	5886
11. Natriumchlorid, krist., z.Analyse	Merck Art.	6404
12. di-Natriumhydrogenphosphat- 12-hydrat, z. Analyse	Merck Art.	6579
13. Nicotinsäure, rein	Merck Art.	500005
14. Pepton aus Casein, trypt.verd. f.d.Bakteriologie	Merck Art.	7213
15. Phenolrot	Merck Art.	7241
16. Phosphorpentoxid-Trockenmittel	Merck Art.	543
17. Pyridoxolhydrochlorid	Merck Art.	500224
18. Riboflavin	Merck Art.	500257
19. Thiamindichlorid	Merck Art.	500923
20. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS-Puffer)	Serva Art.	37190
21. Uracil	Merck Art.	8460
22. Vitamin B ₁₂ , f.biochem.Zwecke	Merck Art.	8521

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. Amberg, B. Die Flockungsreaktion nach RAMON und ihre Anwendung zum Auswerten von Diphtherie- und Tetanus-Serumfraktionen
Med.Diss.Bern (1946)
2. Andrews, P. Estimation of the molecular weights of proteins by SEPHADEX gel-filtration
Biochem.J. 91, 222 (1964)
3. Bard, R.C. u. Gunsalus, I.C. Glucose metabolism of Clostridium perfringens: Existence of a metallo-aldolase
J.Bact. 59, 387 (1950)
4. Boivin, A. u. Izard, Y. Méthode pour la purification, à l'acide trichloracétique, des toxines et anatoxines diphtériques, tétaniques et staphylococciques
C.R.Soc.Biol. 124, 25 (1937)
5. Brieger, L. u. Cohn, G. Untersuchungen über das Tetanus-gift I.
Zschr.Hyg. 15, 1 (1893)
6. D'Antona, D. u. Valensin, M. Préparation de la toxine tétanique par la méthode de R. LEGROUX et G. RAMON
C.R.Soc.Biol. 115, 1209 (1934)
7. Dedic, G.A. u. Koch, O.G. Aerobic cultivation of Clostridium tetani in the presence of cobalt
J.Bact. 71, 126 (1956)
8. Dehmel, H. Methode zur Bestimmung niedriger Tetanus-Antitoxinwerte in kleinen Serummengen
Zschr.Immun.forsch. 94, 97 (1938)
9. Descombey, P. L'anatoxine tétanique
C.R.Soc.Biol. 91, 239 (1924)
10. Descombey, P. Vaccination du cobaye par injection intra-cérébrale d'anatoxine tétanique
C.R.Soc.Biol. 92, 482 (1925)
11. Determann, H. Gelchromatographie
Springer-Verl., Berlin, Heidelberg, New York (1967)

12. Eaton, M.D. u.
Gronau, A. Comparative studies on the purification of tetanus and diphtheria toxins
J. Bact. 36, 423 (1938)
13. Feeney, R.E.,
Mueller, J.H. u.
Miller, P.A. Growth requirements of Clostridium tetani. II. Factors exhausted by growth of the organism
J.Bact. 46, 559 (1943) a)
14. Feeney, R.E.,
Mueller, J.H. u.
Miller, P.A. Growth requirements of Clostridium tetani. III. A "synthetic" medium
J.Bact. 46, 563 (1943) b)
15. Friedemann, U. Dynamics and mechanism of immunity reactions in vivo
Bact.Rev. 11, 275 (1947)
16. Gubarjew, E.M. Bakteriochimija
Gosud.Med.Isd. USSR, Kiew (1952),
dtsh.Ausg.: Bakteriochemie
G.Fischer Verl., Jena (1958)
17. Hardegree, M.C. Separation of neurotoxin and hemolysin of Clostridium tetani
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 119, 405 (1965)
18. Hildebrand, B. Inst.f.Vet.-Path., Berlin
persönl. Mitteilungen (1971)
19. Kaufman, L. u.
Humphries, J.C. Studies of the nutritional requirements of Clostridium tetani.
I. A chemically defined medium
Appl.Microbiol. 6, 311 (1958)
20. Koch, W. u.
Kaplan, D. A simple method for obtaining highly potent tetanus toxin
J.Immunol. 70, 1 (1953)
21. Largier, J.F. Investigation of the tetanus toxin from two different strains of Clostridium tetani
J.Immunol. 76, 393 (1956)
22. Largier, J.F. u.
Joubert, F.J. Investigation of the physical properties of tetanus toxoids
Biochim.Biophys.Acta 20, 407 (1956)
23. Latham, W.C.,
Bent, D.F. u.
Levine, L. Tetanus toxin production in the absence of protein
Appl.Microbiol. 10, 146 (1962)
24. Legroux, R. u.
Ramon, G. Sur la production de la toxine tétanique
C.R.Soc.Biol. 113, 861 (1933)

25. Lerner, E.M. u.
Mueller, J.H. The role of glutamine in the glucose metabolism of "Clostridium tetani"
J.Biol.Chem. 181, 43 (1949)
26. Lev, M. Aerobic cultivation of Clostridium tetani
J.Bact. 72, 718 (1956)
27. Levine, L. u.
Stone, J.L. The purification of tetanus toxoid by ammonium sulfate fractionation
J.Immunol. 67, 235 (1951)
28. Logan, M.A. u.a. Production of Clostridium welchii -toxin
J.Immunol. 51, 317 (1945)
29. Marti, H.G. Normale und anomale menschliche Hämoglobine
Springer-Verl., Berlin, Göttingen, Heidelberg (1963)
30. Maschmann, E. Über Tetanustoxin. I. Mitteilung über bakterielle Toxine
Hoppe-Seylers Zschr.phys.Chemie 201, 219 (1931)
31. Möhlmann, H. u.
Dehmel, H. Die Entwicklung von Toxin und Antigen in Tetanus-Bouillon-Kultur
Arch.exp.Vet.med. 13, 61 (1959)
32. Mueller, J.H. u.
Miller, P.A. Tetanus toxin production on a simplified medium
Proc.Soc.Exp.Biol. 43, 389 (1940)
33. Mueller, J.H. u.
Miller, P.A. Large-scale production of tetanal toxin on a peptone-free medium
J.Immunol. 47, 15 (1943)
34. Mueller, J.H. u.
Miller, P.A. Production of tetanal toxin
J.Immunol. 50, 377 (1945)
35. Mueller, J.H. u.
Miller, P.A. Factors influencing the production of tetanal toxin
J.Immunol. 56, 143 (1947)
36. Mueller, J.H. u.
Miller, P.A. Factors affecting the production of tetanus toxin: temperature
J.Bact. 55, 421 (1948) a)
37. Mueller, J.H. u.
Miller, P.A. Unidentified nutrients in tetanus toxin production
J.Bact. 56, 219 (1948) b)

38. Mueller, J.H. u.
Miller, P.A. Variable factors influencing the
production of tetanus toxin
J.Bact. 67, 271 (1954)
39. Mueller, J.H.,
Miller, P.A. u.
Lerner, E.M. Factors influencing the production
of tetanus toxin: gaseous products
of growth
J.Bact. 56, 97 (1948)
40. Murphy, S.G. u.
Miller, K.D. Tetanus toxin and antigenic deri-
vates. I. Purification of the
biologically active monomer
J.Bact. 94, 580 (1967)
41. Penfold, W.J.,
Tolhurst, J.C. u.
Wilson, D. Active immunization against gas
gangrene and tetanus
J.Path.Bact. 52, 187 (1941)
42. Pickett, M.J.,
Hoeprich, K.P. u.
Germain, R.O. Purification of high titer tetanus
toxin
J.Bact. 49, 515 (1945)
43. Pillemer, L. The immunochemistry of toxins and
toxoids. I. The solubility and pre-
cipitation of tetanal toxin and
toxoid in methanol-water mixtures
under controlled conditions of pH,
ionic strength and temperature
J.Immunol. 53, 237 (1946)
44. Pillemer, L.,
Wittler, R.G. u.
Grossberg, D. The isolation and crystallisation
of tetanal toxin
Science 103, 615 (1946)
45. Pillemer, L.,
Wittler, R.G.,
Burrell, J.I. u.
Grossberg, D.B. The immunochemistry of toxins and
toxoids. VI. The crystallisation
and characterization of tetanal
toxin
J.exp.Med. 88, 205 (1948)
46. Prévot, A.R. u.
Boorsma, H.J. Répartition de l'azote et métabolisme
azoté dans la toxinogénèse tétanique
Ann.Inst.Pasteur 63, 600 (1939)
47. Ramon, G.,
Amoureux, G. u.
Pochon, J. De la production dans la période
actuelle des toxines microbiennes
destinées à l'obtention, en grandes
quantités, des anatoxines, et, en
particulier de la production des
toxines diphtériques, staphylo-
cocciques, tétaniques, au moyen d'un
nouveau milieu de culture à base de
digestion papainique et de viande de
cheval impropre à l'alimentation de
l'homme
Rev.Immunol. 7, 1 (1942)

48. Ramon, G.,
Amoureux, G. u.
Pochon, J. Préparation de la toxine tétanique
à l'aide de digestion papainique
de viande et de foie de cheval
C.R.Soc.Biol. 137, 350 (1943) a)
49. Ramon, G.,
Amoureux, G. u.
Pochon, J. Production de la toxine tétanique
destinée à l'obtention de l'anatoxine
spécifique au moyen de milieux à
base de digestion papainique de
viande et de foie de cheval
Rev.Immunol. 8, 115 (1943) b)
50. Ramon, G.,
Boivin, A. u.
Richou, R. Sur les propriétés floculantes et
immunisantes des anatoxines puri-
fiées par précipitation à l'acide
trichloracétique
C.R.Acad.Sci. 203, 634 (1936)
51. Ramon, G.,
Boivin, A. u.
Richou, R. L'anatoxine tétanique purifiée par
l'acide trichloracétique et son
pouvoir antigène "in vitro" et "in
vivo"
C.R.Soc.Biol. 124, 32 (1937)
52. Ramon, G. u.
Grasset, E. La réaction de floculation et le
dosage du pouvoir antitoxique du
sérum antidiphtérique purifié
C.R.Soc.Biol. 95, 436 (1926)
53. Rauen, H.M. (Hrsg.) Biochemisches Taschenbuch
Springer-Verl., Berlin, Göttingen,
Heidelberg (1956)
54. Raynaud, M. Extraction de la toxine tétanique
à partir des corps microbiens
Ann.Inst.Pasteur 80, 356 (1951)
55. Raynaud, M.,
Nisman, B. u.
Prudhomme, R.O. Extraction de la toxine tétanique
à partir des corps microbiens par
les ultrasons
C.R.Acad.Sci. 230, 1370 (1950)
56. Raynaud, M.,
Turpin, A. u.
Bizzini, B. Existence de la toxine tétanique
sous plusieurs états d'agrégation
Ann.Inst.Pasteur 99, 167 (1960)
57. Regamey, R.-H. L'immunisation active contre le
tétanos
Erg.Mikrobiol. 32, 270 (1959)
58. Renaux, E. Sur la floculation de la toxine
diphtérique par le sérum anti-
diphtérique
C.R.Soc.Biol. 90, 964 (1924)

59. Robb, L.A. Separation of tetanus toxin and toxoid proteins by SEPHADEX gel
Can.J.Microbiol. 13, 1021 (1967)
60. Salenstedt, C.R. u. Tirunakaran, M.O. Purification of tetanus toxin with the aid of SEPHADEX gels
Zschr.Immun.forsch. 130, 190 (1966)
61. Schmidt, H. Tetanus
B.Schultz Verl., Berlin-Grünnewald
(1941). (Behringwerk-Mitteilungen. 13.)
62. Scholz, W. Über die Brauchbarkeit der Flockungsreaktion für die Auswertung antitoxischer Sera (insbesondere des Diphtherieantitoxins)
Zbl.Bakt.I. Orig. 91, 72 (1924)
63. Smith, L.D.S. u. Holdeman, L.V. The pathogenic anaerobic bacteria
C.C.Thomas, Springfield Ill. USA
(1968). S. 269 ff.
64. Stöffler, G. Inst.f.molekulare Biologie d. Max-Planck-Ges., Berlin
persönl. Mitteilungen (1970)
65. Stone, J.L. A modified Mueller medium without native protein for tetanus toxin production
Appl.Microbiol. 1, 166 (1953)
66. Stone, J.L. u. Levine, L. Effect of the elimination of native proteins on the yield and purification capacity of tetanus toxoid
Appl.Microbiol. 2, 262 (1954)
67. Surján, M. The large scale production of tetanus toxin
Schweiz.Zschr.allg.Path. 19, 311 (1956)
68. Tasman, A. u. Ramshorst, J.D. van On the preparation and properties of a new tetanus-prophylactic, the "tetanus P T"
Antonie van Leeuwenhoek 18, 357 (1952)
69. Taylor, E.M. Production of tetanal toxin
J.Immunol. 50, 385 (1945)
70. Van Heyningen, W.E. Bacterial toxins
Blackwell, Oxford (1950). S. 22

71. Van Heyningen, W.E. The proteins. Chemistry, biological activity and methods.
Bd. 2, Teil A. H. Neurath &
K. Bailey Ed., Acad. Press, New
York (1954)
72. Waibel, J. Der Tetanusantitoxingehalt im
Blute bei Pferden nach Impfung
mit Tetatoxoid
Vet.med.Diss. München (1955)
73. Willis, A.T. Clostridia of wound infection
Butterworths, London (1969).
S. 385 ff.
74. Zuger, B., Potentiation of tetanus toxin by
Hollander, A. u. tissues and chemicals
Friedemann, U. J.Infect.Dis. 65, 86 (1939)
75. - SEPHADEX
Eine kurze Einführung in das Ver-
fahren der Gelfiltration
Pharmacia Uppsala, Schweden (o.J.)
76. - Uvicord (Prospekt)
LKB-Produkte AB, Stockholm,
Schweden (o.J.)

Am Ende meiner Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. H. Hartwig für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei meiner Arbeit.

Gleichfalls danken möchte ich allen Angehörigen des Instituts für die Hilfe, die sie mir bei der Lösung meiner Aufgabe bereitwillig zuteil werden ließen.

Besonderer Dank gebührt Herrn Dr. Stöffler und seinen Mitarbeitern, die mir durch Bereitstellung der Apparaturen für die Gelchromatographie und ihre Hilfe bei der technischen Durchführung der Versuche einen wesentlichen Teil meiner Arbeit ermöglichten.

Lebenslauf

Ich wurde am 22. Juni 1942 in Berlin geboren. Meine Staatsangehörigkeit ist deutsch.

Im Februar 1945 mußte meine Mutter mit mir den Wohnsitz der Familie in Königsberg/Pr. verlassen. Wir wurden in Berlin ansässig, wo ich von 1948 bis 1955 die Volksschule in Berlin-Friedrichsfelde besuchte.

Nach der Übersiedlung nach West-Berlin besuchte ich bis 1962 das Falk-Gymnasium in Berlin-Tiergarten. Im Jahre 1964 legte ich die Reifeprüfung für Schulfremde ab und begann im Sommersemester 1964 das Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin. Die tierärztliche Vorprüfung bestand ich am 6. Mai 1966, die tierärztliche Prüfung am 15. Oktober 1969. Am 9. Januar 1970 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt.

Meine dreimonatige Praktikantenzeit absolvierte ich im Frühjahr 1968 bei Herrn Walter Rietbrock in Harsefeld, Kreis Stade.

Seit dem 1. Februar 1970 bin ich am Institut für Veterinär-Hygiene der Freien Universität Berlin als wissenschaftlicher Assistent mit Teilzeitvertrag tätig.

